



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

**RESPOSTAS TRANSCRICIONAIS NO MANTO DE OSTRAS
DO MANGUE, *Crassostrea brasiliiana* EXPOSTA A
FENANTRENO**

TALITA MIGUELÃO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Afonso Celso Dias Baíny

Florianópolis

2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Miguelão, Talita

RESPOSTAS TRANSCRICIONAIS NO MANTO DE OSTRAS DO MANGUE,
Crassostrea brasiliana EXPOSTA A FENANTRENO / Talita
Miguelão ; orientador, Afonso Celso Dias Bainy -
Florianópolis, SC, 2014.

82 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Bioquímica.

Inclui referências

1. Bioquímica. 2. Bioquímica. 3. Genes de
biotransformação, de estresse oxidativos e apoptóticos. 4.
Fenantreno. Hidrocarboneto aromático policíclico. 5.
Crassostrea brasiliana, Manto. I. Celso Dias Bainy, Afonso
. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de
Pós-Graduação em Bioquímica. III. Título.

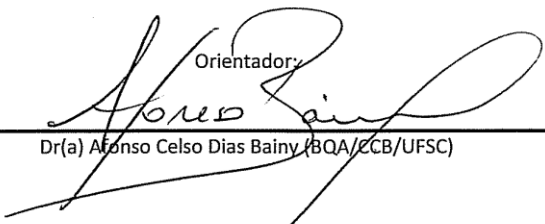
**“RESPOSTAS TRANSCRICIONAIS NO MANTO DE OSTRAS DO
MANGUE, *Crassostrea brasiliana* EXPOSTAS A FENANTRENO”**

Por

Talita Miguelão

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da
Banca Examinadora (33/PPGBQA/2014) do Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica – UFSC, composta pelos doutores:

Orientador:

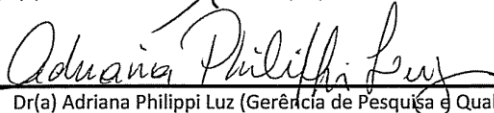


Dr(a) Afonso Celso Dias Bainy (BQA/CCB/UFSC)

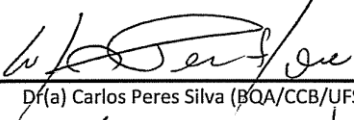
Banca examinadora:



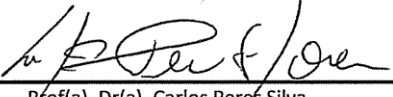
Dr(a) Camilo Dias Seabra Pereira (Dep. Ciência do Mar/UNIFESP)



Dr(a) Adriana Philippi Luz (Gerência de Pesquisa e Qualidade
Ambiental/GEPQUAM/FATMA)



Dr(a) Carlos Peres Silva (BQA/CCB/UFSC)



Prof(a). Dr(a). Carlos Peres Silva
Coordenador(a) do Programa de Pós Graduação em Bioquímica

Florianópolis, 15 de dezembro de 2014.

AGRADECIMENTOS

A toda minha família, por estarem ao meu lado, me apoiando, compreendendo todos os momentos que não estive presente, e principalmente a Isabelli e Paulo por entenderem todo o meu estresse, e minha falta de paciência e tempo, amo muito todos vocês !!!

MUITO OBRIGADA ao meu orientador Prof. Dr. Afonso Celso Dias Bainy, que me aceitou como orientanda, acreditou no meu potencial, ajudou e apoiou o desenvolvimento deste trabalho. Por ter me dado a oportunidade de fazer parte de seu laboratório e crescer cada vez mais, me instigando sempre a buscar o conhecimento e a enfrentar os obstáculos que surgiram.

Ao Jacó J. Mattos meu muito obrigada, por partilhar comigo o seu tempo e seu conhecimento, obrigada pela dedicação e paciência, você foi muito importante para a realização deste trabalho.

A Isis M. Martins dos Reis, por ter cedido suas amostras sem egoísmo, para o desenvolvimento deste trabalho, meu Muito Obrigada!!!

Agradeço ao Guilherme Toledo e Silva, por todo o auxílio e disposição nas análises de bioinformática das quais precisei e você sempre esteve a disposição, muito obrigada!

Agradeço a todos os Labcaianos e Labcaianas, que estiveram direta ou indiretamente ligados ao desenvolvimento deste trabalho, por todo o apoio, colaboração, incentivo, ajuda, conselhos que foram de

grande importância não só neste trabalho, mas durante todo o mestrado. Agradeço a todos pelos momentos vividos e as experiências compartilhadas, Obrigada.

Agradeço a meus grandes amigos Miriam Cristina Gualdezi, Laura Freitas S. de Oliveira, Gabriel M. Matos, Ana Paula de M. Fraga e Yara Guarezi por estarem comigo todo este tempo, nos momentos difíceis e nos momentos alegres, por toda a paciência em me ouvir e pelos conselhos dados, amo muito vocês.

Agradeço as minhas queridas amigas Tatiana Milane Cordeiro, Shayla Barbieri, Rafaela Pino Gomes e Naissa Maria Danielli que me incentivaram e ajudaram na realização do mestrado, adoro vocês.

Agradeço ao Prof. Dr. Alcir e a todos do LabDef, por abrirem as portas do laboratório, para que eu pudesse vivenciar a rotina de laboratório, por ter ensinado a base de como fazer pesquisa, e por todos os ensinamentos aprendidos e que vou carregar comigo, muito obrigada, vocês foram importantes na minha decisão de iniciá-lo.

Agradeço também ao professor e orientador da graduação Glauber Wagner, por ter me ensinado o começo de tudo, a aprender e gostar de pesquisa, e por todo o incentivo.

A Universidade Federal de Santa Catarina, ao programa de Pós-Graduação em Bioquímica, ao NEPAQ e ao LABCAI pelo apoio e estrutura nestes dois anos de mestrado.

Agradeço ao REUNI e a CAPES- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela bolsa concedida durante o período do mestrado.

Aos professores e colegas de Pós-Graduação pelos ensinamentos repassados, entusiasmo e alegrias divididas.

Aos membros da banca examinadora por aceitarem o convite e se disponibilizarem a participar da avaliação deste trabalho.

MUITO OBRIGADA A TODOS!!!

Dedico este trabalho a minha família, principalmente a minha princesinha Isabelli e ao meu pai (um grande guerreiro), por toda a dedicação, amor e compreensão que me proporcionaram.

RESUMO

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) estão entre os principais contaminantes nos ambientes aquáticos. Dentre os HPAs, o fenantreno é um dos mais abundantes nos ambientes marinhos. Além dos danos causados ao ecossistema, a bioacumulação deste xenobiótico pelos animais pode alterar sua homeostase, através da indução de várias respostas para sua eliminação. Entre estas, está a indução de genes que codificam proteínas envolvidas com a biotransformação, defesas antioxidantes e apoptose. Mecanismos de defesas contra xenobióticos são amplamente estudados em animais vertebrados principalmente mamíferos, no entanto em invertebrados ainda existem poucas informações, comparativamente. A compreensão dos mecanismos moleculares de defesas desses animais auxiliará na sua utilização como biomarcadores de contaminação ambiental. Para esses estudos são necessários organismos modelos, como a ostra do mangue *Crassostrea brasiliana*, que se apresenta como um organismo sentinela adequado para avaliação e monitoramento de ambientes contaminados. Este trabalho analisa a transcrição de genes relacionados a vias de biotransformação e de defesa celular contra xenobióticos no manto desta espécie. O xenobiótico utilizado foi o HPA fenantreno, sendo realizada a exposição dos animais em duas concentrações subletais ($100 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $1000 \mu\text{g.L}^{-1}$), e três tempos de exposição (1, 5 e 10 dias). Foi observada uma indução na transcrição de genes da biotransformação de fase I (*CYP2A1*, *CYP2C8-like*, *CYP17A1-like* e *CYP3A-like*) e genes envolvidos com a apoptose (*Caspases* 7, 8 e *p53*), principalmente nos animais expostos na concentração de $1000 \mu\text{g.L}^{-1}$ de fenantreno. Os resultados observados mostram que a exposição desses animais ao fenantreno, desencadeia uma série de respostas transcricionais, evidenciando estratégias de proteção do organismo frente a uma agressão química, de forma semelhante ao que ocorre em mamíferos. Os resultados demonstram ainda que o manto apresenta respostas destes sistemas de transcrição mais tardias em relação à brânquia e a glândula.

Palavras chaves: *Crassostrea brasiliana*, biotransformação, defesas antioxidantes, apoptose e fenantreno.

ABSTRACT

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are among the main contaminants in aquatic environments. Among the PAHs phenanthrene is one of the most abundant in marine environments. In addition to the damage to the ecosystem, bioaccumulation of xenobiotic by animals can change its homeostasis, by inducing several defense systems to its elimination. Among these is the induction of genes that encode proteins involved in biotransformation, antioxidant defenses and apoptosis. Defense mechanisms against xenobiotic exposure are widely studied in mammals mainly vertebrates, however in invertebrates there is little information, comparatively. Understanding the molecular mechanisms of defense of these animals will aid in their use as biomarkers of environmental contamination. Model organisms are required to run these studies, such as the mangrove oyster *Crassostrea brasiliana*, which is a suitable sentinel organism for evaluation and monitoring of contaminated environments. This work analyzes the transcription of genes related to biotransformation pathways and cellular defense against xenobiotics in the mantle of this species. Phenanthrene, a model PAH, was used in the exposure of the animals. Experiments were carried out using two sublethal concentrations (100 and 1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$), and three exposure times (1, 5 and 10 days). Induction was observed in the transcription of genes Phase I biotransformation (CYP2A1, CYP2C8-like CYP17A1-like and CYP3A-like), and genes involved in apoptosis (Caspases 7, 8 and p53), especially in animals exposed to the concentration 1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ phenanthrene. Our results show that exposure of these animals to phenanthrene, triggers a cascade of transcriptional responses, indicating protection strategies of the organism to a chemical aggression, similarly to what occurs in mammals. The results further demonstrate that the mantle shows later transcriptional responses than the gill and the gland when exposed to this chemical.

Keywords: *Crassostrea brasiliana*, biotransformation, antioxidant defenses, apoptosis and phenanthrene

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fases da biotransformação de xenobióticos realizado pelas enzimas de metabolização	31
Figura 2: Vias de morte celular por Apoptose, mediada pelo receptor de morte e mitocôndrial	39
Figura 3: Manutenção das ostras <i>C. brasiliana</i> (= <i>C. gasar</i>) nos aquários de vidro, cobertos por caixas plásticas para minimização da evaporação do fenantreno.....	46
Figura 4: Níveis de transcritos relativos ao gene constitutivo <i>28s ribosomal</i> em amostras do manto de ostras <i>C. brasiliana</i> expostas por diferentes tempos e concentrações de fenantreno	54
Figura 5: Níveis de transcritos relativos de diferentes isoformas de <i>CYP450</i> em amostras do manto de ostras <i>C. brasiliana</i> expostas por diferentes tempos e concentrações de fenantreno	56
Figura 6: Níveis de transcritos relativos de diferentes isoformas de <i>GST</i> em amostras do manto de ostras <i>C. brasiliana</i> expostas por diferentes tempos e concentrações de fenantreno	57
Figura 7: Níveis de transcritos relativos a genes de defesas antioxidantes em amostras do manto de ostras <i>C. brasiliana</i> expostas por diferentes tempos e concentrações de fenantreno	58
Figura 8: Níveis de transcritos relativos de diferentes genes envolvidos com apoptose em amostras do manto de ostras <i>C. brasiliana</i> expostas por diferentes tempos e concentrações de fenantreno	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Iniciadores para amplificação dos genes de biotransformação de ostras *Crassostrea brasiliana*.49

Tabela 2. Iniciadores para amplificação dos genes de defesas antioxidantes de ostras *Crassostrea brasiliana*..... 50

Tabela 3. Iniciadores para genes apoptóticos de ostras *Crassostrea brasiliana*.50

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AIF – Acrônimo do inglês *Apoptosis inducing factor* (Fator de indução de apoptose).

Apaf-1 - Acrônimo do inglês *Active Principle of Fraction 1* (Princípio ativo da fração 1).

Ah - Acrônimo do inglês *aromatic hydrocarbons* (hidrocarbonetos aromáticos).

AhR - Acrônimo do inglês *aromatic hydrocarbons receptor* (receptor de hidrocarbonetos aromáticos).

Bcl-2 - Acrônimo do inglês *B-cell lymphoma 2* (linfoma 2 das células beta).

CAT – Catalase.

cDNA - Sequência nucleotídica complementar de DNA.

CYP – Citocromo P450.

Ct – *Threshold cycle*.

DISC – Acrônimo do inglês *Death Inducing Signaling Complex* (complex de sinalização indutor da morte).

DMSO – Dimetil Sulfóxido.

DNA-PK – Proteína cinase dependente do DNA.

EROs – Espécies reativas de oxigênio.

FAS – Proteína de sinalização celular.

FADD – Proteína de sinalização celular associada ao domínio de morte.

GPx – Glutathione peroxidase.

GST – Glutathione S-Transferase.

GST π – Glutathione S-Transferase Pi.

$\cdot\text{OH}$ - Radical hidroxil.

HPA – Hidrocarboneto policíclico aromático.

HSP – Proteína de choque térmico.

H_2O_2 – Peróxido de hidrogênio.

IAP – Inibidores de apoptose.

NADH – Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzida.

NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido.

NO – Óxido nítrico.

$\text{O}_2^{\cdot-}$ - Radical ânion superóxido.

ONOO $^{\cdot-}$ – Peroxinitrito.

PCBs – Acrônimo do inglês *Polychlorinated biphenyls* (Bifenilas policloradas).

PDC - Acrônimo do inglês *Programmed cell death* (Morte celular programada).

PCR – Acrônimo do inglês *Polymerase chain reaction* (Reação em cadeia da polimerase).

p53 – Proteína 53.

qPCR – Reação em cadeia da polimerase em tempo real.

RO – Radical peroxil.

RFLP - Acrônimo do inglês *Restriction Fragment Length Polymorphism* (Fragmento de restrição de polimorfismo)

SOD – Superóxido dismutase.

TNF – Acrônimo do inglês *Tumor necrose factor* (Fator de necrose tumoral).

TNFR – Acrônimo do inglês *Tumor necrose factor receptor* (Receptor do fator de necrose tumoral).

TRAIL – Acrônimo do inglês *Tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand* (Ligante induzido por apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	25
1.1 Os Oceanos e a contaminação.....	25
1.1.1 FENANTRENO COMO CONTAMINANTE.....	27
1.2 Biomarcadores de contaminação	29
1.2.1 BIOTRANSFORMAÇÃO	30
1.2.2 DEFESAS ANTIOXIDANTES E ESTRESSE OXIDATIVO	33
1.2.3 APOPTOSE	35
1.3 Organismos bioindicadores.....	40
1.4 Ostra do mangue e o manto	31
2 OBJETIVOS	34
2.1 Objetivos gerais	34
2.2 Objetivos Específicos.....	44
3 MATERIAIS E MÉTODOS	45
3.1 Obtenção dos animais e exposição.....	45
3.1.1 Coleta do material biológico	45
3.1.2 Bioensaios – Condições de exposição.....	45
3.1.3 Manutenção das ostras nos aquários	47
3.1.4 Coleta dos tecidos e armazenamento	48
3.2 Preparação das amostras e análise molecular.....	48

3.2.1 Extração do RNA total e síntese do cDNA.....	48
3.2.2 <i>PCR</i> quantitativo em tempo real (<i>qPCR</i>).....	49
3.3 Análise estatística	52
4. RESULTADOS.....	43
4.1 Respostas transcricionais dos genes de biotransformação.....	54
4.2 Respostas transcricionais dos genes de defesa antioxidante.....	57
4.3 Respostas transcricionais dos genes envolvidos na apoptose	58
5. DISCUSSÃO	61
6. CONCLUSÕES	72
REFERÊNCIAS.....	74

1. INTRODUÇÃO

1.1 Os Oceanos e a contaminação

Os ecossistemas aquáticos contém uma grande biodiversidade de organismos que podem ser afetados por perturbações no equilíbrio destes ambientes. Mesmo com propriedades distintas, os ambientes aquáticos são interligados, pois a água doce deságua nos oceanos, carregando consigo o que nela é despejado (PALAZZI *et al.*, 2014).

Ao longo da história não se acreditava que o ser humano pudesse influenciar diretamente na vida aquática, particularmente nas condições dos ecossistemas marinhos, pois apenas perturbava inconsequentemente a região costeira, não chegando à região de mar aberto. No entanto, com o desenvolvimento industrial, houve um aumento exacerbado na produção, aumentando o requerimento energético. O surgimento da indústria química, a expansão da agricultura, entre outras causas, estão relacionadas a um aumento no lançamento de resíduos no ambiente, que atingem todos os ecossistemas, incluindo os oceanos (DONEY, 2010).

O crescimento acelerado da atividade antropogênica, vem causando alterações significativas no ambiente (HALPERN *et al.*, 2008, DONEY, 2010). Para compreender os efeitos causados pelos contaminantes aos seres vivos e ao ambiente surgiram estudos em Ecotoxicologia. A Ecotoxicologia é uma ciência dentro da Toxicologia, destinada ao estudo dos efeitos/impactos dos compostos e seus componentes sobre o ecossistema (MOORE *et al.*, 2004). Além disso, a

ecotoxicologia investiga os efeitos tóxicos das substâncias químicas e agentes físicos, sobre organismos vivos, a nível individual, de comunidades e de populações (FERNICOLA *et al.*, 2004).

Existe uma grande diversidade de contaminantes ambientais que podem causar danos ao organismo e ao ambiente de forma isolada, ou através da interação de seus efeitos (MOORE *et al.*, 2004).

Existem muitas fontes de contaminação constantes no ambiente, principalmente associadas à liberação: do esgoto sanitário, de resíduos associados à combustão incompleta dos automóveis, de resíduos químicos liberados pelas indústrias, e de resíduos de pesticidas ou inseticidas agrícolas. A liberação constante destes compostos acaba levando ao acúmulo no solo, e através da lixiviação são lançados no mar (LIVINGSTONE, 2001; MOORE *et al.*, 2004). Alguns compostos quando isolados não são prejudiciais aos organismos marinhos, mas quando presentes e associados com outras substâncias podem se tornar altamente tóxicos. Essa toxicidade pode ocorrer em uma determinada região ou pelo transporte atmosférico ou aquático e apresentarem seus efeitos em outras localidades (MOORE *et al.*, 2004).

Para o conhecimento dos efeitos da exposição a um xenobiótico é necessária a padronização de métodos específicos que visem, o entendimento do fenômeno, permitindo o posterior desenvolvimento de medidas mitigatórias eficientes (BOWEN & DEPLEDGE, 2006).

Neste contexto, são encontrados diversos tipos de contaminantes no ambiente aquático, que incluem HPAs (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos), pesticidas organoclorados, PCBs (bifenilas policlorados),

dibenzeno-p-dioxinas, nitroaromáticos, componentes heterocíclicos, organometálicos, organofosforados, estrogênicos, e uma diversidade de metais, que apresentam mecanismos de toxicidade bastante diversos (LIVINGSTONE, 2001).

Apesar de ocorrer por processos naturais, a introdução de HPAs no ambiente geralmente é resultado de atividades antropogênicas, sendo uma constante preocupação mundial (RAMDINE *et al.*, 2012).

Os HPAs têm sido encontrados em concentrações elevadas em ambientes aquáticos, como estuários e manguezais (RAMDINE *et al.*, 2012), e em razão de suas características tóxicas, mutagênicas e carcinogênicas são considerados poluentes com potencial prejudicial aos animais expostos (CHAVAN & KRISHNAMURTHY, 2012; RAMDINE *et al.*, 2012).

1.1.1 FENANTRENO COMO CONTAMINANTE

Os HPAs são uma classe de compostos que apresentam em sua composição dois ou mais anéis aromáticos fundidos, com um alto potencial de poluição, toxicidade aguda e cancerígena, podendo ser encontrados na forma gasosa ou particulada, e facilmente dispersos no ambiente (LIN *et al.*, 2005; REIS-HENRIQUES *et al.*, 2009). Estes compostos hidrofóbicos podem ser facilmente incorporados por organismos aquáticos (YIN *et al.*, 2007). Entretanto animais expostos a HPAs apresentam um aumento na expressão e atividade de enzimas de biotransformação de fase I, tais como citocromo P450, principalmente

pertencentes à subfamília *CYP1A* (Citocromo P450 1A). Esses animais também apresentam um aumento na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) como consequência do aumento na biotransformação destes compostos, que levam a um estresse oxidativo nos animais expostos (LIVINGSTONE, 2001).

Os hidrocarbonetos passam a compreenderem até 75% da composição inicial do petróleo, dos quais o fenantreno é um membro importante e muito estudado (ALBERS, 2003).

Fenantreno é um HPA tricíclico, semivolátil, abundante e amplamente encontrado nestes ambientes (IRWIN, 1997; YIN, *et al.* 2007). O fato de o fenantreno possuir a região de baía, que é uma característica presente em HPAs com propriedades ou potencial carcinogênico, o fenantreno ainda não demonstrou propriedade carcinogênica (ZHONG, 2011).

Diversos estudos têm demonstrado que o fenantreno provoca alterações em vias metabólicas de biotransformação, de estresse e do sistema imune em várias espécies de animais aquáticos, como peixes e bivalves. Desta forma, o fenantreno passou a ser um bom modelo para estudos dos mecanismos de defesa de animais aquáticos contra HPAs (YIN *et al.*, 2007; HANNAM *et al.*, 2010; LÜCHMANN *et al.*, 2011).

1.2 Biomarcadores de contaminação

Os biomarcadores são parâmetros biológicos que refletem as interações entre o componente tóxico e o sistema biológico que podem servir como ferramentas auxiliares no diagnóstico da qualidade ambiental. Existem três classes de biomarcadores: os de exposição ou dose interna, os de efeito e o de suscetibilidade (PEDROZO, 2004).

Em estudos de monitoramento ambiental os biomarcadores mais utilizados são os de efeito, pois evidenciam alterações ou desequilíbrios nos organismos, quando estes sofrem interferência ecológica, podendo ser encontrados em células, órgãos, e tecidos (MONSERRAT *et al.* 2007). Esses biomarcadores podem ser classificados como específicos ou não específicos. Específicos são aqueles que respondem a xenobióticos específicos como a metalotioneína utilizada para indicar a presença de metais traço. Enquanto os biomarcadores não específicos são os que afetam diretamente ou indiretamente o equilíbrio da homeostase do organismo (BAINY *et al.*, 1996; MONSERRAT *et al.*, 2007).

O emprego de biomarcadores em estudos de ecotoxicologia tem o intuito de caracterizar áreas impactadas por diferentes misturas de poluentes ambientais. Sendo uma alternativa que tem obtido sucesso, principalmente pelo fato de buscar alterações biológicas, como bioquímicas, moleculares ou fisiológicas nos animais expostos, antes que estas alterações tenham efeito em níveis mais elevados de organização como órgãos e tecidos (MONSERRAT *et al.*, 2007).

A aplicação de técnicas moleculares tem contribuído para fornecer informações úteis na elucidação de mecanismos bioquímicos e moleculares relacionados aos mecanismos de biotransformação e defesas antioxidantes de animais bivalves, bem como colaborar com a compreensão dos efeitos de um componente tóxico nesses animais (LÜCHMANN *et al.*, 2012; ZANETTE *et al.*, 2010).

Muitos trabalhos têm apresentado resultados significativos com relação à biomarcadores, pois esses resultados indicam efeitos diversos causados por xenobióticos em diferentes espécies de animais. Em bivalves, os biomarcadores estão contribuindo para compreensão de efeitos causados por contaminantes em diferentes órgãos (LÜCHMANN *et al.* 2014; RODRIGUES *et al.* 2015; SERRANO *et al.* 2015).

1.2.1 BIOTRANSFORMAÇÃO

A biotransformação é compreendida como um conjunto de alterações bioquímicas que visam formar derivados mais polares e/ou solúveis em água. O resultado esperado através do processo de biotransformação é que os derivados das substâncias apresentem efeitos tóxicos diminuídos ou inexistentes. Contudo, nem sempre o resultado obtido é o esperado. Em alguns casos o produto de biotransformação das substâncias tem seus efeitos potencializados (AZEVEDO & LIMA, 2004).

Através da biotransformação o organismo facilita a eliminação de xenobióticos, podendo ser excretado com sua composição inalterada ou

como metabólitos derivados (AZEVEDO & LIMA, 2004). A biotransformação ocorre em três fases distintas (Figura 1), a fase I é realizada por dois grupos de monooxigenases microsossomais, as flavoproteínas monooxigenases e as heme-proteínas Citocromo P450 monooxigenases; na fase II a catálise é realizada por enzimas de conjugação e a fase III inclui as proteínas transportadoras (STEGEMAN & LECH, 1991; OMIECINSKI *et al.*, 2011).

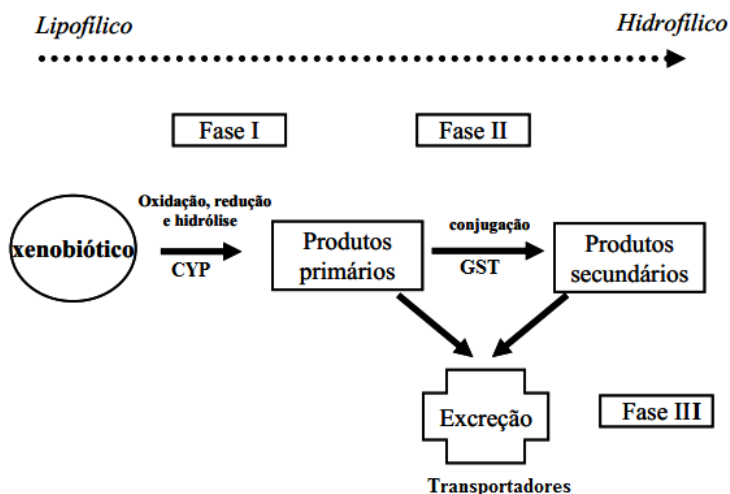


Figura 1: Fases da biotransformação de xenobióticos realizado pelas enzimas de metabolização (adaptado de ORELLANA & GUAJARDO, 2004).

As reações de fase I da biotransformação compreendem reações de oxidação, redução e hidrólise que podem introduzir ou expor grupos funcionais em moléculas de xenobióticos. Estas modificações tornam os compostos mais hidrofílicos, facilitando assim sua excreção. A reabsorção destes compostos é dificultada ou adaptada, para que possam

sofrer as modificações necessárias na fase II (MEYER, 1996; PARKINSON, 2008). As enzimas do grupo dos citocromos P-450 realizam a biotransformação de uma variedade de xenobióticos (OMIECINSKI *et al.*, 2011), e em certas condições é responsável pelo aumento na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), no organismo (VALAVANIDIS *et al.*, 2006).

A fase II da biotransformação é caracterizada por reações de conjugação, sendo realizadas por enzimas transferases. Essas reações podem ser glucuronidação, sulfatação, metilação, acetilação, conjugação com glutathione, e conjugação com aminoácidos, sendo que o produto resultante dessas reações de conjugação da fase II tende a ser mais hidrofílico que o xenobiótico de origem, facilitando a sua excreção (OMIECINSKI *et al.*, 2011). Em geral as reações de conjugação são catalisadas pelas enzimas transferases como glutathione-S-transferase (*GST*), UDP-glucuronosil transferases, sulfotransferases e as reações de redução pelas epóxido hidrolase e quinona redutase (HAYES & PULFORD, 1995). As enzimas *GST* têm função na conjugação de xenobióticos ou produtos resultantes do estresse oxidativo com glutathione, demonstrando seu papel fundamental no mecanismo de biotransformação de xenobióticos (HAYES & PULFORD, 1995; HAYES *et al.*, 2005).

Diversas classes de xenobióticos apresentam a capacidade de induzir ou aumentar a transcrição de genes codificadores de enzimas de biotransformação nos organismos mamíferos (OMIECINSKI *et al.*, 2011). ZANETTE *et al.* (2010) apresentaram uma anotação de vários *CYPs* em ostra *Crassostrea* e mexilhão *Mytilus*, evidenciando a

importância destes sistemas de biotransformação nestas espécies. Outro estudo realizado por LÜCHMANN *et al.* (2014) mostra a indução de genes da fase I e da fase II em ostras expostas ao fenantreno, demonstrando que bivalves são responsivos a este HPA. MEDEIROS *et al.* (2008) observou também a indução de genes da biotransformação, no entanto as ostras foram expostas ao esgoto sanitário, sustentando assim que a biotransformação está presente nesses animais, como via de defesa contra a toxicidade dos diferentes tipos de xenobióticos. ZHANG *et al.* (2012) identificaram no genoma da ostra *Crassostrea gigas*, 136 genes que codificam diferentes isoformas de citocromo P450, evidenciando uma impressionante expansão gênica deste sistema de biotransformação em bivalves, que pode estar associada a sua existência e permanência no ambiente há milhões de anos.

1.2.2 DEFESAS ANTIOXIDANTES E ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo é estabelecido quando os mecanismos de defesas antioxidantes não conseguem manter o equilíbrio entre a geração e a neutralização de espécies reativas de oxigênio (EROs), ocorrendo algum dano celular (OGURA & SHIMOSAWA, 2014). Os radicais livres são moléculas de oxigênio altamente reativas que possuem um elétron desemparelhado. São classificadas como EROs o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxil (OH^{\cdot}), o peroxinitrito ($ONOO^{\cdot-}$), e radicais de lipídios alcóxil (OGURA & SHIMOSAWA, 2014). Os sistemas de defesa antioxidante protegem o organismo dos danos causados pela produção de EROs, pois auxiliam na neutralização e

eliminação desses radicais. Caso ocorra uma falha neste mecanismo podem ocorrer danos a membrana celular, ao DNA, e proteínas, entre outros (VALAVANIDIS *et al.*, 2006).

O equilíbrio entre a taxa de formação e decomposição de EROs na célula é realizada através de mecanismos antioxidantes como mencionado anteriormente, e essa via conta com algumas enzimas para a realização dos processos catalíticos como a superóxido dismutase (SOD) que dismuta o O_2 em H_2O_2 , catalase, glutathione peroxidase (GPx) que reduzem o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água (H_2O) e oxigênio (O_2). A SOD Cu/Zn, a SOD Mn e a SOD extracelular são isoformas encontradas respectivamente no citosol, na matriz mitocondrial, e nos fluídos extracelulares (OGURA & SHIMOSAWA, 2014). O H_2O_2 não apresenta um elétron desemparelhado, contudo reage com o Fe^{3+} , e produz o radical hidroxil altamente reativo (OGURA & SHIMOSAWA, 2014). Existem também os antioxidantes não enzimáticos como a GSH, vitamina C e E, betacaroteno e catequina (VALAVANIDIS *et al.*, 2006; OGURA & SHIMOSAWA, 2014).

A exposição à xenobióticos e consequentemente biotransformação podem gerar um aumento na produção de EROs e induzir uma situação de estresse oxidativo causando danos celulares aos organismos marinhos (BANNI *et al.*, 2010; LÜCHMANN *et al.*, 2011). Nos invertebrados o aumento da produção de EROs, pode desencadear a indução de uma série de eventos celulares, como transcrição gênica, ativação de vias de sinalização como apoptose, alteração no metabolismo, devido a peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e

dano ao DNA e afetar a sobrevivência levando a morte da célula (TREVISAN *et al.*, 2014).

Diferentes invertebrados marinhos apresentam sistemas de proteção contra estresse oxidativo semelhantes aos mecanismos caracterizados em vertebrados, entretanto as vias de sinalização ainda não estão bem definidas em invertebrados (BAINY *et al.*, 1996; LÜCHMANN *et al.*, 2011; KOUTSOGIANNAKI *et al.*, 2014; PARRILLA-TAYLOR & ZENTENO-SAVÍN, 2011; TREVISAN *et al.*, 2014).

1.2.3 APOPTOSE

A apoptose é o processo fisiológico contínuo de morte celular programada tipo I (*PDC - programmed cell death*) não inflamatória em organismos multicelulares. É um mecanismo geneticamente programado caracterizado por uma série de eventos bioquímicos, que possibilita a morte celular em situações de estresse extremo (PORTT *et al.*, 2011; SCHULZE-OSTHOFF *et al.*, 1998). Contudo, a morte celular por apoptose, acontece de forma ordenada, e os eventos ocorrem após a clivagem do DNA genômico. As vias apoptóticas apresentam um papel fundamental em vários eventos biológicos como na morfogênese, renovação celular e a remoção de células nocivas. O equilíbrio no processo de apoptose garante ao organismo seu funcionamento saudável (SCHULTZ & HARRINGTON JR, 2003).

A apoptose permite que o organismo multicelular possa se proteger e se defender contra danos que interfiram em suas funções normais, como a manutenção da homeostase celular, desenvolvimento

celular ou patologias que afetem sua sobrevivência, pois permite a eliminação de células danificadas (PORTT *et al.*, 2011; QU *et al.*, 2014). A distinção entre a apoptose e morte necrótica se deve ao fato da apoptose ser um processo intimamente regulado pela indução de estímulos específicos, assim não há a liberação de mediadores inflamatórios, não prejudicando o tecido (SCHULTZ & HARRINGTON JR, 2003).

Os processos apoptóticos mais estudados são as vias intrínseca e extrínseca. A via intrínseca é regulada nas mitocôndrias e a extrínseca é mediada por alguns receptores pertencente à superfamília de receptores de fator de necrose tumoral (*TNFR*) (PORTT *et al.*, 2011; SCHULZE-OSTHOFF *et al.*, 1998).

Em mamíferos via intrínseca da apoptose é ativada em resposta a estímulos citotóxicos ou de estressores ambientais. Esta via é centrada e regulada na mitocôndria, onde se inicia pela ligação de ligantes da superfamília de *TNF* ao seu receptor de membrana celular, sendo da superfamília de genes de *TNFR*. Após os receptores transmitirem sinais apoptóticos e promover a perturbação da mitocôndria, esta perturbação ativa a caspase, a qual pode provocar a abertura do complexo do poro de transição da permeabilidade mitocondrial, que leva a ruptura da membrana mitocondrial externa, liberando o citocromo c do espaço intermembranar para o citosol (SCHULZE-OSTHOFF *et al.*, 1998; SCHULTZ & HARRINGTON JR, 2003). Além do citocromo c, a mitocôndria libera *AIF* (Fator de indução de apoptose), endonuclease G e *p53* entre outros componentes (KISS, 2010). O citocromo c então induz a formação do apoptossomo (Apaf-1/ Citocromo c/ Caspase 9)

(PORTT *et al.*, 2011; CALVAR *et al.*, 2013; MEDHIOUB *et al.*, 2013). O apoptossomo ativa a caspase iniciadora, geralmente a caspase 8 ou 9, que por sua vez irá ativar a caspase 3 efetora ou executora, a qual é responsável por clivar determinados substratos, levando a célula a morte por apoptose. Através da fragmentação do DNA e outras alterações fisiológicas e bioquímicas (PORTT *et al.*, 2011; CALVAR *et al.*, 2013).

Nos vertebrados a regulação dos processos da via intrínseca na mitocôndria é realizada por uma proteína da família linfoma 2 das células beta (Bcl-2), a qual promove a regulação por liberação de sinais apoptóticos, onde esta família é composta por membros anti e pró-apoptóticos. Os invertebrados apresentam os membros desta família conservados, por este motivo acredita-se que a função desta família de proteínas permaneça a mesma para invertebrados. Além da família Bcl-2, a apoptose também é regulada por inibidores de caspases, inibidores de apoptose (IAPs) e proteínas de choque térmico (*HSPs*) (MEDHIOUB *et al.*, 2013). A Bcl-2 está localizada principalmente na membrana mitocondrial externa, mas pode ser encontrada no retículo endoplasmático e no envelope nuclear externo, regulando a apoptose pela mitocôndria, por controlar a liberação do citocromo c para o citosol (SCHULTZ & HARRINGTON JR, 2003).

A via intrínseca mitocondrial também sofre regulação por outra família de proteínas supressoras tumorais p53. A função mais estudada relacionada à p53 é o seu papel como um fator de transcrição, pois ativa a transcrição de inúmeros genes alvos, bem como pode ativar a transcrição de genes pró-apoptóticos e reprimir genes anti-apoptótico (KARPINICH *et al.*, 2002.; MOLL *et al.*, 2005).

Contudo a p53 também possui função não transcricional, como a regulação da via intrínseca da apoptose por ativação da Bcl-2, com isto a p53 promove a ativação de proteínas pró-apoptóticas e consequentemente induz a apoptose. A promoção da apoptose pela p53, ocorre em respostas a estímulos apoptóticos, que transloca a p53 para a mitocôndria, e assim a p53 interage com membros da família da Bcl-2. Essa interação causa perturbações no potencial de membrana da mitocôndria, iniciando a cascata apoptótica (KARPINICH *et al.*, 2002.; MOLL *et al.*, 2005).

Uma proteína pró-apoptótica regulada transcionalmente pela p53 é a Bax. Estudos realizados por KARPINICH *et al.* (2002) com células de fibroblastos, demonstraram que Bax tem sua expressão aumentada, quando ocorre a ativação da p53 pelo complexo DNA-PK (DNA-dependente da proteína cinase). A p53 apresenta também uma função reguladora na progressão do ciclo celular, identificando possíveis erros no DNA (KARPINICH *et al.*, 2002.; MOLL *et al.*, 2005).

Na via extrínseca da apoptose a ativação é realizada através de sinais extracelulares mediados por receptores de morte celular. A mediação pode ocorrer por um subgrupo de receptor de fator de necrose tumoral (*TNFR*), uma superfamília que inclui o *TNFR*, *FAS* e o *TRAIL* (PORTT *et al.*, 2011; MEDHIOUB *et al.*, 2013).

A iniciação dessa via apoptótica também ocorre pela ação de ligantes da superfamília de *TNF* ao seu receptor de membrana celular, sendo da superfamília de genes de *TNFR*. Os receptores *TNF* então recrutam a proteína de sinalização celular *FAS* associada ao Domínio de

morte (*FADD*), formando o complexo de sinalização (*DISC*), induzindo a ativação de uma caspase iniciadora. Com a ativação das caspases iniciadoras como a caspase 8, 9 e 10, elas induzem a sinalização do complexo de morte. Onde ativa a caspase efetora podendo ser a 3 ou a 7 que dará seqüências aos eventos da apoptose como fragmentação do DNA genômico (PORTT *et al.*, 2011; MEDHIOUB *et al.*, 2013).

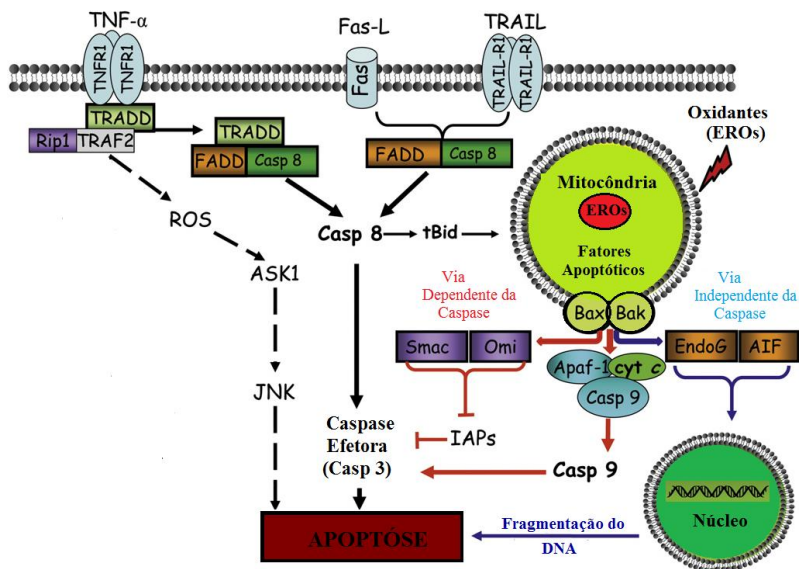


Figura 2: Vias de morte celular por Apoptose, mediadas pelo receptor de morte e mitocondrial. (Adaptado de CIRCU & AW, 2010).

Tanto a via intrínseca quanto a via extrínseca são bem caracterizadas em vertebrados (Figura 2), no entanto em invertebrados particularmente em moluscos, poucos são os estudos relacionados ao processo de sinalização da morte celular por apoptose (QU *et al.*, 2014). Contudo alguns estudos mostram que genes apoptóticos também são expressos em invertebrados, no caso *C. gigas*, e são semelhantes aos

genes encontrados em vertebrados, sugerindo um sistema semelhante entre ambos, quando os animais são submetidos a situações de estresse (MEDHIOUB *et al.*, 2013). Outro fator importante é o processo de apoptose ser fundamental para as respostas do sistema imune de moluscos (MEDHIOUB *et al.*, 2013).

No entanto a apoptose em moluscos apresenta-se eficiente na manutenção da homeostase imunológica, removendo células danificadas, senescentes, infectadas, sem a necessidade de resposta inflamatória, e recrutando novas células em situações fisiológicas adequadas. Contudo se os eventos apoptóticos são excessivamente induzidos, estes podem acabar prejudicando o organismo e disseminar ainda mais a infecção, principalmente se o organismo estiver sofrendo estresse de fatores externos, como de poluentes ambientais (KISS, 2010; TERAHARA & TAKAHASHI, 2008).

1.3 Organismos bioindicadores

Estudos utilizando biomarcadores têm sido realizados com o intuito de compreender as respostas dos organismos quando estes estão sofrendo algum estresse ambiental (BAINY, 2000; LÜCHMANN *et al.*, 2011; ZANETTE *et al.*, 2010).

Os biomarcadores analisados em organismos sentinelas são importantes para a avaliação da qualidade de ambientes aquáticos. Os organismos filtradores como moluscos bivalves apresentam vantagens como organismos sentinela, pois são organismos sésseis, filtradores,

bem distribuídos, possuem relevância econômica e capacidade de bioacumulação (BAINY, 2000; CAJARAVILLE *et al.*, 2000; BEBIANNO & BARREIRA, 2009; RAMDINE *et al.*, 2012).

Técnicas moleculares têm auxiliado no monitoramento da poluição aquática, principalmente em bivalves, pois resultados como a publicação do genoma de *C. gigas* por ZHANG *et al.* (2012) e as comparações realizadas com outras espécies, demonstraram uma adaptação evolutiva importante desta espécie de ostra, referente a sistemas de defesas contra o estresse. Da mesma forma, LÜCHMANN (2012) realizou um transcriptoma de *C. brasiliana* e observou dados relacionados à adaptação desse organismo exposto aos contaminantes fenantreno, fração acomodada em água do óleo diesel e esgoto sanitário.

Além disso, com o crescente valor econômico da produção de ostras no Brasil nas últimas décadas, o cultivo destes moluscos passou a ser uma importante fonte de renda de muitas famílias residentes em municípios costeiros do Brasil (FERREIRA & OLIVEIRA NETO, 2008).

1.4 Ostra do mangue e o manto

A ostra do mangue *C. brasiliana* apresenta uma grande importância econômica, em programas de monitoramento ambiental e de aquicultura, por ser encontrada desde o litoral norte até o sul do Brasil (LAZOSKI *et al.*, 2011).

A ostra *C. brasiliana* é classificada como:

Reino: Animalia. Filo: Mollusca. Classe: Bivalvia. Subclasse: Pteriomorpha. Ordem: Ostreoida. Família: Ostreidae. Gênero: *Crassostrea*. Espécie: *Crassostrea brasiliana*

No entanto, estudos relacionados com as diferentes espécies de *Crassostrea* têm sido realizados a fim de compreender a similaridade entre as espécies do Oceano Atlântico ocidental. Nestes estudos quando comparadas as espécies de *C. brasiliana* e *C. gasar* (variação da espécie *Crassostrea africana*), estas apresentam uma grande similaridade genética, com sequências idênticas do gene 16S entre si, e diferentes entre as outras espécies de *Crassostrea* (LAZOSKI *et al.*, 2011). As análises genéticas realizadas indicaram um agrupamento da *C. brasiliana* e *C. gasar*, indicando as duas como uma única espécie. Resultados de *Restriction Fragment Length Polymorphism* – RFLP, demonstram que as ostras *C. gasar* apresentam dois padrões de restrição diferentes o H1 e H2, e as ostras *C. brasiliana* apresentam somente o padrão de restrição H2, reforçando ainda mais a sugestão de que a ostra *C. brasiliana* seja sinônima a *C. gasar* (LAZOSKI *et al.*, 2011).

Devido a sua importância econômica e relevância em estudos anteriores com a ostra do mangue *C. brasiliana* (= *Crassostrea gasar*), demonstrando respostas moleculares importantes quando expostas ao fenantreno e outros poluentes ambientais, este trabalho agrega informações complementares e demonstra respostas a nível transcricional no tecido do manto desta espécie de ostra.

Neste contexto o trabalho foi realizado com ostras do mangue *C. brasiliana*, expostas a duas concentrações de fenantreno (100 µg.L⁻¹ e

1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$) durante 1, 5 e 10 dias. O tecido utilizado para realizar as análises transcricionais de sistemas de biotransformação, defesas antioxidantes e apoptose foi o manto. A principal função do manto é secretar a concha, mas também tem uma função sensorial e pode iniciar o fechamento das válvulas, em resposta a condições ambientais desfavoráveis, controlando a entrada de água para dentro da câmara inalante e, além disso, ele tem uma função respiratória (RUPPERT, FOX, BARNES, 2005.). Estudo anterior realizado por PINO-GOMES (2013) mostrou que o manto é o tecido que apresentou maiores níveis de respostas transcricionais das isoformas *CYP2A12* e *CYP30C1* em ostras *C. gigas* mantidas em um local contaminado por efluentes sanitários. Estas isoformas estão relacionadas àquelas estudadas no presente trabalho e, portanto decidiu-se avaliar como o manto estaria respondendo a exposição ao fenantreno, visto que este era o mais abundante HPA detectado no tecido dos animais expostos no ambiente contaminado (PINO-GOMES, 2013).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar a transcrição de alguns genes no manto de ostra do mangue *C. brasiliiana* exposta a fenantreno.

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar a transcrição de genes relacionados à biotransformação de fase I e II, no manto de ostras *C. brasiliiana* expostas ao fenantreno.
- Analisar transcritos gênicos que codificam enzimas de defesas antioxidantes no manto de ostras *C. brasiliiana* expostas ao fenantreno.
- Analisar transcritos gênicos relacionados a apoptose no manto de ostras *C. brasiliiana* expostas ao fenantreno.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção dos animais e exposição

O manto de ostras *C. brasiliiana* utilizados no presente estudo foram cedidos pela aluna de pós-graduação do departamento de Aquicultura (UFSC) Isis Mayna Martins dos Reis, que foi responsável pela realização do experimento, bem como, exposição e coleta.

3.1.1 Coleta do material biológico

Os animais foram coletados no Laboratório de Cultivo de Moluscos Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina (LCMM-UFSC) localizado na praia de Sambaqui em Florianópolis, SC. Foram utilizadas ostras do mangue *C. brasiliiana* com comprimento de 5 a 7,5cm. A exposição ao fenantreno, bem como o processamento e as análises das ostras foram realizados no Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica (LABCAI-UFSC).

3.1.2 Bioensaios – Condições de exposição

Após um período de aclimação de 7 dias no LMM, as ostras foram transportadas ao LABCAI e acomodadas em aquários por 24 h, antes da exposição ao contaminante.

O fenantreno foi dissolvido em DMSO (dimetil sulfóxido) formando uma solução estoque e foi adicionado na água dos aquários

nas concentrações de $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $1000 \mu\text{g.L}^{-1}$, equivalente a 0,56 e 5,6 μM , onde a concentração de DMSO não excedeu a 0,01% (v/v) do volume total do tanque. As duas concentrações subletais de fenantreno foram escolhidas através de estudos anteriores realizadas com *C. brasiliensis* (LUCHMANN, 2012).

As ostras foram acomodadas em três aquários, onde cada aquário continha 60 ostras. O volume útil de água do mar em cada aquário foi de 60 litros, com aeração constante (1L por animal de água do mar filtrada em $0,45 \mu\text{m}$), a 21°C e salinidade de 25 ppt e cobertos com tampa de vidro (Figura 1).



Figura 3: Visão geral dos aquários de vidro contendo ostras *C. brasiliensis* mantidos dentro de caixas plásticas supridas de filtros de ar para minimização da contaminação do ar por fenantreno (REIS, 2014).

Nos aquários referentes ao tratamento 1 e 2, foram adicionadas diariamente as quantidades de fenantreno equivalente a uma concentração nominal final de $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $1000 \mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente. Dois aquários contendo somente água (sem ostras),

idênticos aos tratamentos com as duas concentrações de fenantreno citadas anteriormente, foram utilizados para verificar o desaparecimento de fenantreno na água independente da presença de ostras. Todos os aquários foram mantidos dentro de caixas plásticas para que a evaporação do fenantreno fosse minimizada. O grupo controle foi exposto às mesmas condições, porém somente foi adicionado DMSO 0,01% (v/v).

A concentração de fenantreno na água foi monitorada em amostras coletadas imediatamente antes das coletas dos animais nos dias 1, 5 e 10 dias e quantificadas em espectrofluorímetro utilizando uma curva padrão. A solução estoque foi utilizada para preparar a solução de uso a cada 24 horas até o final do experimento, para manter as concentrações de exposição. Ostras dos três grupos foram coletadas e dissecadas para as análises de qPCR em tempo real, nos tempos de 1, 5 e 10 dias. O efluente líquido gerado diariamente no experimento foi tratado com carvão ativado, monitorado a quantidade de fenantreno em espectrofluorímetro e posteriormente descartado, quando não era detectado o contaminante na água.

3.1.3 Manutenção das ostras nos aquários

Após o início da exposição, diariamente no período da manhã era realizada a sifonagem dos aquários e alimentação das ostras. Primeiramente, o nível da água era diminuída por completo nos aquários e realizada a sifonagem; em seguida, era renovado 50% da capacidade dos aquários com água e a quantidade de microalga para a alimentação das ostras e completado com água até atingir a capacidade final [(água do mar + microalga) = 1 litro\ostra].

As ostras eram alimentadas uma vez ao dia com microalgas (*Chaetoceros muelleri* e *Isochrysis galbana*) totalizando uma densidade de 15×10^4 cel.mL⁻¹ proporcional entre as duas espécies de microalgas. Cerca de uma ou duas horas depois, após a assimilação das microalgas pelas ostras, quando a água deixava de ser turva e tornava-se transparente, os aquários eram sifonados e a água salgada era renovada por completo. Após esta etapa, o fenantreno era adicionado nos aquários com ostras e sem ostras, de acordo com os tratamentos.

Ao longo dos 10 dias de experimento, não houve mortalidade de ostras.

3.1.4 Coleta dos tecidos e armazenamento

Dez ostras de cada concentração expostas ao fenantreno e mantidas no grupo controle, foram mortas e dissecadas após exposição de 1, 5 e 10 dias. Após a dissecação foi retirado o manto e colocado imediatamente em RNA *later*, para a preservação do RNA. Após as amostras foram armazenadas a -20°C.

3.2 Preparação das amostras e análise molecular

3.2.1 Extração do RNA total e síntese do cDNA

A extração de RNA total foi realizada nas amostras de manto dos animais controle e expostos. O RNA total foi extraído utilizando o reagente TRIZOL (Invitrogen, Estados Unidos), seguindo as instruções do fabricante. A quantificação do material extraído foi realizada em espectrofotômetro (NanoDrop, Thermo Scientific) a partir das leituras a

260/280nm. As amostras foram armazenadas a -80°C até a realização das análises. A partir de $1\mu\text{g}$ de RNA total foi realizada a síntese de cDNA com o kit Quantitech Reverse Transcription (Qiagen, Reino Unido), seguindo as instruções do fabricante. Em seguida as amostras foram armazenadas a -20°C .

3.2.2 PCR quantitativo em tempo real (*qPCR*)

Os iniciadores foram desenhados a partir do transcriptoma de *C. brasiliensis* realizado por Lückmann (2012). Foram escolhidas 15 sequências para as análises de transcrição gênica por *PCR* quantitativo (*qPCR*) em tempo real. As sequências gênicas escolhidas são referentes a genes envolvidos com a biotransformação, defesas antioxidantes e apoptose. Os pares de iniciadores apresentados nas tabelas 1, 2 e 3, foram desenhados seguindo os critérios do *site Integrated DNA Technologies (IDT)*, utilizando-se a ferramenta *PrimerQuest*.

Tabela 1. Iniciadores desenhados para amplificação dos genes de biotransformação de ostras *C. brasiliensis*.

Gene		Sequência do iniciador
<i>CYP450 2A1</i>	<i>Forward</i>	AAC GGC AAG AGG TGT AAG GTT TGC
	<i>Reverse</i>	TAA TCC ATC ACC CGG ATT GGC AGA
<i>CYP450 2C8-like</i>	<i>Forward</i>	TCG TGC TCC TTT ACG AGT TGA CGA
	<i>Reverse</i>	ATA TGC CGG GAG ATC CAT GTC GAA
<i>CYP450 3A-like</i>	<i>Forward</i>	AGT GGA CGT CAA CAA CTG GAT CGT
	<i>Reverse</i>	TGG AAC ACC ATA CCT CCG GAA CAA
<i>CYP450 17A1-like</i>	<i>Forward</i>	TGT TCA GGC CCA ACA ACT CTG TCA

<i>GST Microsomal 1-like</i>	<i>Reverse</i>	GGG AGT GGA CTC AAC CAG ATT CAC AA
	<i>Forward</i>	AAC CAT GTT AAT GGG CGC TCT GAC
<i>GST π-like</i>	<i>Reverse</i>	CCA CCA ACA CGA AGG GAA ACA CAT
	<i>Forward</i>	ATG GCG TTG GAT TGC ACT AAC TGG
<i>Ribossomal 28s-like</i>	<i>Reverse</i>	ACG GAC GCT ACT GGT GGA CAA TAA
	<i>Forward</i>	TGT GCG CAA GTC ATT GGG TGT T
	<i>Reverse</i>	ACC ATC TTT CGG GTA CCA ACG TGT

Tabela 2. Iniciadores desenhados para amplificação de genes de enzimas de defesa antioxidante de ostras *C. brasiliiana*.

Gene		Sequência do iniciador
<i>Catalase-like</i>	<i>Forward</i>	TAC AAC CAC ATC GAG GAC GGG AAG
	<i>Reverse</i>	TCC TTC TGG GAC CAT ACC TTG GTG
<i>SOD-like</i>	<i>Forward</i>	GCT CCA GAG GAT ACT GAG AGG CAT
	<i>Reverse</i>	CCA ATG ATG GAT TGA GGA CCA GCA

Tabela 3. Iniciadores desenhados para amplificação de genes relacionados com a apoptose de ostras *C. brasiliiana*.

Gene		Sequência do iniciador
<i>BcL-2-like</i>	<i>Forward</i>	CCG AAA CCG CTC AGT CCA CAT TT
	<i>Reverse</i>	GGG CAT ATT ACG AGA CAC GCA TTC TAC T
<i>Caspase 7-like</i>	<i>Forward</i>	CGG CTG GTC TCT TTA ACA ACA AAC GGA
	<i>Reverse</i>	TGG TCT TGC CAT CAT CTG TGT AAA TGC C
<i>Caspase 8-like</i>	<i>Forward</i>	GCA GGG AAG CCG AAG TTG TTC TTC AT
	<i>Reverse</i>	ATG ATC CAC CTC AAG GTC ACT GTC CA
<i>Caspase 10-like</i>	<i>Forward</i>	AGG AGG CTA AGA AGA TAG TCA ACC ACC A

	<i>Reverse</i>	GGG TTT GTT CCT GAGGGCTCTACATT
<i>P53-like</i>	<i>Forward</i>	GGCTCATGGAAGATGCTGTGGATTGT
	<i>Reverse</i>	AGACGAGGACACCACCAGTCTACAAA

Para a realização da reação de *PCR* quantitativo (*qPCR*), o *cDNA* foi diluído em uma concentração de 100ng/μl e foram utilizados 8μl por reação. A curva padrão das reações de *qPCR* foi padronizada para o manto, a partir de um *pool* de *cDNA* contendo uma mesma quantidade de todas as amostras expostas e controle de todos os tempos de exposição. A partir do *pool* de *cDNA* foi realizado uma diluição seriada.

Os níveis de transcrição gênica foram quantificados através de reações de *PCR* Quantitativo (*qPCR*), utilizando o *QuantiFast SYBR Green PCR Kit (Qiagen)*. Para a reação de *qPCR* foi utilizado um volume final de 20μl, onde 10μl foi do *QuantiFast SYBR Green*, 1μl de cada iniciador (1μM) e 8μl do *cDNA* diluído (100ng/reação), em um termociclador *ROTOR-GENE-Q (Qiagen, Alemanha)*, utilizando um rotor de 100 poços, seguindo os parâmetros de padronização de cada gene, a fim de garantir o mínimo de variação e a alta precisão na quantificação do *qPCR*.

As condições da reação de *qPCR* foram: 95°C por 5 minutos, 40 ciclos de 10 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C, de acordo com o fabricante. O resultado foi submetido à análise da curva de dissociação – *melting* (temperatura de 55°C a 95°C, aumentando a cada 1°C, dependendo da fluorescência adquirida) para a confirmação da amplificação de um único produto. A eficiência da reação de *PCR* (*E*) foi determinada para cada par de iniciadores, através da curva padrão de diluição seriada.

O programa *Qiagen Rotor Gene Q Series Software* foi utilizado para a análise das reações, onde o *software* encontrou o valor da fluorescência das amostras em que cada uma das reações atingia uma amplificação exponencial superando as taxas basais de fluorescência (*threshold*) e o ciclo no qual ele ocorre (*Ct- threshold cycle*).

A eficiência da curva foi analisada correlacionando a quantidade de *cDNA* com o *Ct* da amostra. Foi realizada a regressão linear e a eficiência da curva através dos dados da equação como linearidade (R^2) e coeficiente angular (*M*).

Os dados gerados foram submetidos ao teste de Grubbs para analisar possíveis *outliers*, os quais foram retirados e o número de amostras em alguns grupos passaram de 10 para 9 para realizar a análise estatística.

3.3 Análise estatística

A análise estatística dos transcritos gênicos foi realizada pelo *software GraphPad Prism 5.0*. Os resultados estão apresentados como média \pm desvio padrão. Os dados foram analisados pelos testes não paramétricos de Kruskal-Wallis e Dunns e considerados estatisticamente significativos com $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

Os biomarcadores moleculares compõe um conjunto de ferramentas que auxiliam na compreensão dos efeitos dos xenobióticos sobre os organismos e podem ser incorporados em programas de monitoramento de exposição a contaminantes visando evitar impactos de maiores proporções ao ambiente (BAINY *et al.*, 1996; MONSERRAT *et al.*, 2007; YIN *et al.*, 2007; HANNAM *et al.*, 2010; LÜCHMANN *et al.*, 2011; 2012).

Neste contexto este trabalho avaliou respostas de transcrição gênica no manto de ostras *C. brasiliiana*, diferentemente de estudos anteriores realizados em brânquia e glândula digestiva (MEDEIROS *et al.*, 2008; Zanette, 2009; LÜCHMANN *et al.*, 2013; 2014), visando analisar o grau de resposta deste tecido frente à exposição ao fenantreno.

Os dados relativos da transcrição dos genes de interesse no manto das ostras expostas ao fenantreno e do grupo controle, foram normalizados pelo gene constitutivo *Ribosomal 28s-like* (Figura 4), uma vez que o mesmo não apresentou nenhuma diferença estatística significativa, na sua transcrição entre os grupos.

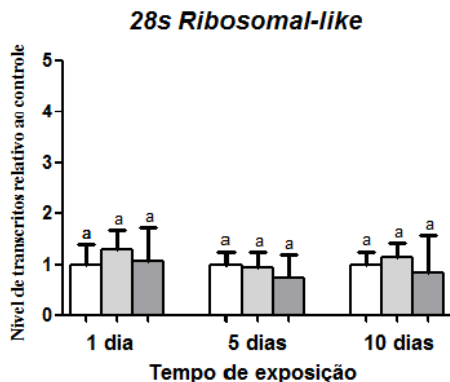


Figura 4: Níveis de transcritos relativos ao gene constitutivo *28s ribosomal* em amostras do manto de ostras *C. brasiliiana* expostas em diferentes tempos a fenantreno sob concentrações variadas: (□) controle – DMSO; (▤) exposto a 100 µg.L⁻¹ de fenantreno; (■) exposto a 1000 µg.L⁻¹ de fenantreno.

4.1 Respostas transcricionais dos genes de biotransformação

Foram observadas diferenças na transcrição dos genes envolvidos nas fases I e II de biotransformação de xenobióticos, nas ostras expostas ao fenantreno. A Figura 5 apresenta os níveis relativos de transcritos referentes aos genes de citocromo P450 (*CYP*) (*CYP 2A1*, *CYP 2C8-like*, *CYP 3A-like* e *CYP 17A1-like*), do manto de ostras expostas ao fenantreno por 1, 5 e 10 dias e do grupo controle.

Os animais expostos por 1 dia a 100 µg.L⁻¹ apresentaram níveis de transcritos para o gene de *CYP2A1*, 0,7 vezes menores em relação ao grupo controle. Ainda nos animais expostos por 1 dia, os níveis de transcritos, apresentaram níveis de 1,2 vezes maior na concentração de

1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ em relação aos animais expostos a 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Os animais expostos por 10 dias para a concentração 1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ apresentou níveis em média de 1,5 vezes maiores que o grupo controle (Figura 5A).

Os níveis de transcrição do gene *CYP2C8-like* apresentaram diferenças significativas somente nos animais expostos por 24 h a 1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ em relação ao animais expostos a 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Após 5 e 10 dias de exposição os níveis de transcrição deste gene estavam semelhantes entre os grupos (Figura 5B).

O gene *CYP3A-like* apresentou níveis significativamente maiores (2,5 vezes) de transcritos nos animais expostos por 5 dias, a 1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de fenantreno em relação ao grupo controle (Figura 5C).

O perfil de transcrição do gene *CYP17A1-like* foi semelhante ao do *CYP2C8-like* (Figura 5D). Após 24 h de exposição os animais expostos a 1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ apresentaram níveis de transcrição 1,2 vezes maiores do que os animais expostos a 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Nenhuma alteração na transcrição destes genes foi observada após 5 e 10 dias de exposição.

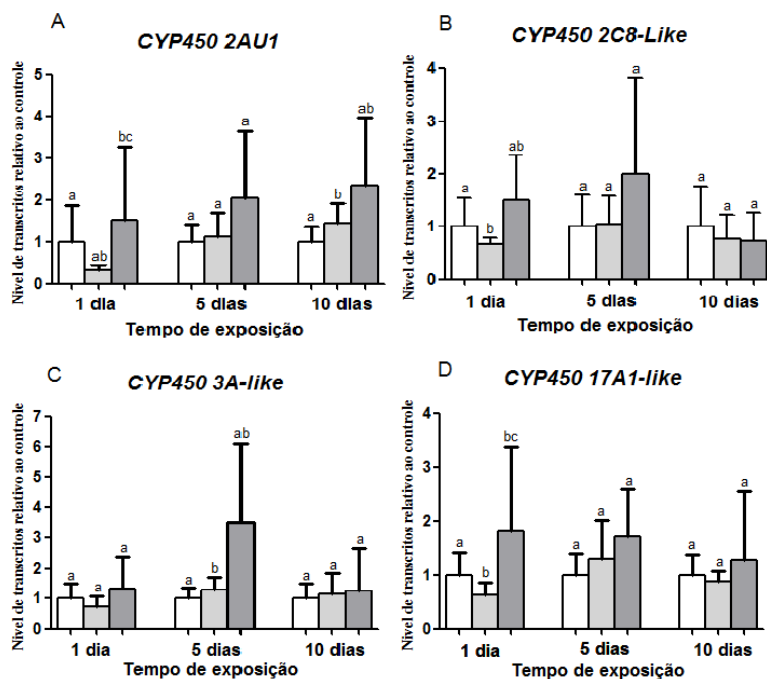


Figura 5: Níveis de transcritos relativos de isoformas de *CYP* do manto de ostras *C. brasiliana* expostas em diferentes tempos e concentrações de fenantreno : (□) controle – DMSO; (▒) exposto a 100 µg.L⁻¹ de fenantreno; (■) exposto a 1000 µg.L⁻¹ de fenantreno. Valores significativos quando $p < 0,05$.

A Figura 6 apresenta os dados referentes a transcrição de genes pertencentes ao sistema de biotransformação de fase II, mostrando os níveis relativos de transcritos de duas isoformas de glutathione S-transferase (GST) (*GST microsomeal 1-like* e *GSTπ-like*) em manto de *C. brasiliana* expostas a fenantreno a diferentes concentrações e tempos.

Os resultados referente ao gene *GST microsomeal 1-like*, os animais expostos por 1 dia a 100 µg.L⁻¹ apresentaram níveis de transcritos de 0,5 vezes menor em relação aos animais grupo controle.

Enquanto que as exposições de 5 e 10 dias não apresentaram nenhuma diferença significativa (Figura 6A).

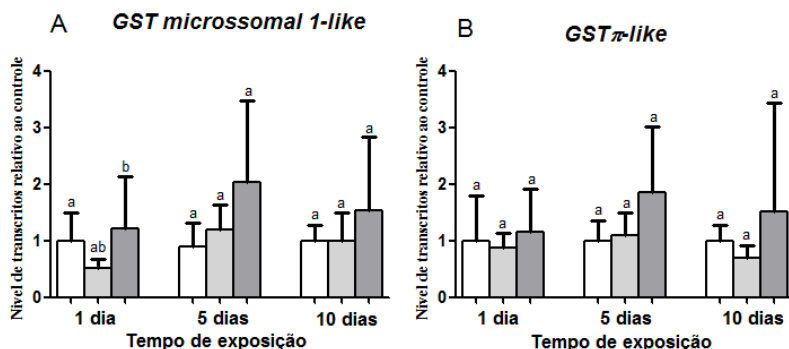


Figura 6: Níveis de transcritos relativos de duas isoformas de *GST* em amostras do manto de ostras *C. brasiliana* expostas em diferentes tempos e concentrações de fenantreno: (□) controle – DMSO; (▤) exposto a 100 µg.L⁻¹ de fenantreno; (■) exposto a 1000 µg.L⁻¹ de fenantreno. Valores significativos quando $p < 0,05$.

A transcrição da *GSTπ-like*, não apresentou nenhuma diferença significativa em nenhum tempo de exposição, nem entre as concentrações (Figura 6B).

4.2 Respostas transcricionais dos genes de defesa antioxidante

Os genes de defesa antioxidante envolvidos no mecanismo de proteção contra o estresse oxidativo analisados, foram a *Catalase-like* e a *Sod-like Cu/Zn* (Superóxido dismutase- like cobre/zinco) e o resultado dos níveis transcricionais são apresentados na Figura 7.

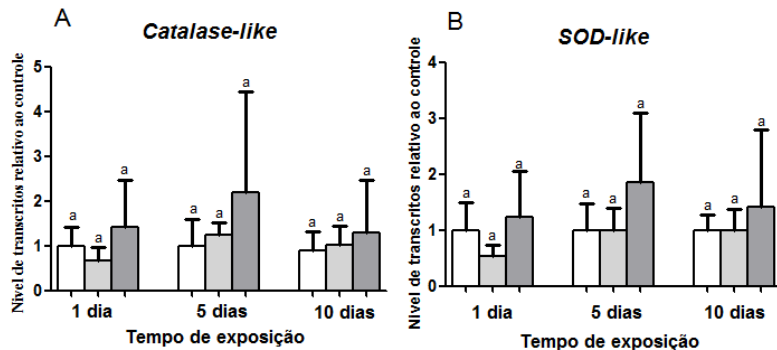


Figura 7: Níveis de transcritos relativos de genes de defesa antioxidante em amostras do manto de ostras *C. brasiliana* expostas em diferentes tempos e concentrações de fenantreno: (□) controle – DMSO; (▤) exposto a 100 µg.L⁻¹ de fenantreno; (■) exposto a 1000 µg.L⁻¹ de fenantreno. Valores significativos quando $p < 0,05$.

Nenhuma alteração significativa na transcrição da *Catalase-like* foi observada entre os grupos experimentais (Figura 7A). Os níveis de transcritos referentes ao gene *SOD-like Cu/Zn*, também não demonstraram nenhuma diferença significativa entre os tempos ou concentração de exposição (Figura 7B).

4.3 Respostas transcricionais dos genes envolvidos na apoptose

Com relação aos biomarcadores moleculares relacionados a apoptose, foram analisados genes da via intrínseca e extrínseca, *Bcl 2-like*, *Caspase 8-like*, *Caspase 10-like*, *Caspase 7-like* e *P53-like* (Figura 8).

Nenhuma alteração na transcrição do gene *Bcl 2-like* foi observada entre os animais dos diferentes grupos experimentais (Figura 8A).

O gene da *Caspase 8-like*, apresentou uma transcrição 1 vez maior nos animais expostos por 24 h a 1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de fenantreno em relação ao animais expostos a 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Figura 8B). Após 5 e 10 dias não foram observadas diferenças entre os grupos.

Os níveis de transcritos relativos relacionados ao gene da *Caspase 10-like*, não apresentaram nenhuma alteração significativa na transcrição deste gene, em relação ao tempo ou concentração de exposição (Figura 8C).

Após 24 horas, a transcrição do gene da *Caspase 7* foi 0,7 vezes maior nos animais expostos a concentração 1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ em relação ao grupo exposto a 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de fenantreno, já na concentração de 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ em relação ao controle houve uma diminuição de 0,5 vezes. O grupo de animais expostos por 5 dias a 1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de fenantreno apresentaram uma transcrição 1 vez maior do que os animais controle (Figura 8D).

O gene da proteína 53 (*p53*) somente apresentou níveis de transcrição mais elevados (1,2 vezes) nos animais expostos por 10 dias a 1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de fenantreno, em relação ao grupo controle (Figura 8E).

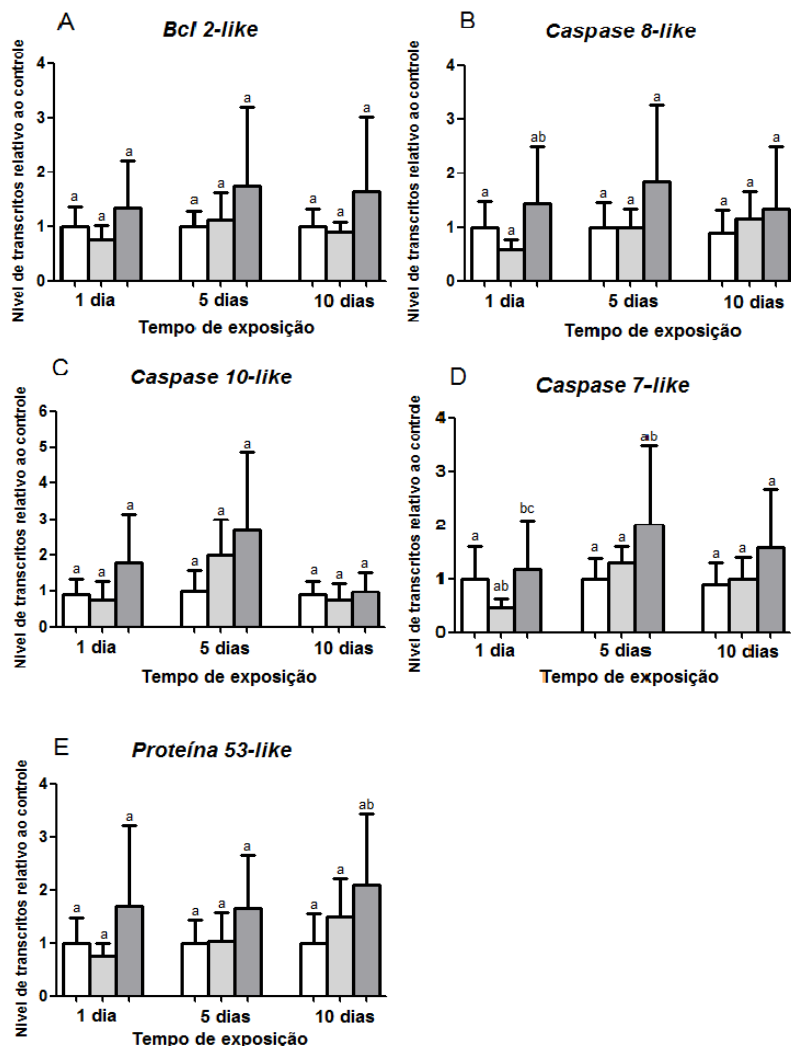


Figura 8: Níveis de transcritos relativos de diferentes genes relacionados com a apoptose em amostras do manto de ostras *C. brasiliana* expostas em diferentes tempos e concentrações de fenantreno: (□) controle – DMSO; (▤) exposto a 100 µg.L⁻¹ de fenantreno; (■) exposto a 1000 µg.L⁻¹ de fenantreno. Valores significativos quando $p < 0,05$.

5. DISCUSSÃO

Os HPAs são uma classe de compostos relativamente abundantes no meio aquático devido ao seu uso como combustível de embarcações, combustão incompleta de combustíveis fósseis, atividades de exploração de petróleo, processamento e distribuição de derivados, bem como de derramamentos acidentais (BEKKI *et al.*, 2013). Os HPAs ao serem absorvidos pelo organismo podem ser biotransformados por enzimas de fase I, tais como CYP, principalmente da família CYP1A (BEKKI *et al.*, 2013) e de fase II, tais como as GSTs (PUSHPARAJAH *et al.*, 2008). Dependendo de sua estrutura química e acoplamento com o sítio ativo dos diferentes CYPs, este processo pode levar a um aumento na produção de EROs. Este processo pode causar dano ao DNA (ZANGAR *et al.*, 2004) gerar estresse oxidativo (YIN *et al.*, 2007), e estabelecer um quadro apoptótico (KUSUHARA *et al.*, 1999).

Um dos HPAs mais abundantes encontrados no ambiente é o fenantreno, composto que tem sido muito utilizado como modelo por suas características de baixo peso molecular e toxicidade (IRWIN, 1997; YIN *et al.*, 2007).

É bem caracterizado que HPAs induzem respostas de enzimas de biotransformação, em razão de suas funções na metabolização de xenobióticos (LIVINGSTONE, 2001). O padrão geral de respostas transcricionais dos genes *CYPs* analisados, apresentaram uma tendência de aumento dependente da concentração até 5 dias de exposição, entretanto apenas o gene *CYP3A-like* apresentou diferenças estatísticas

neste tempo. Somente o gene *CYP2AUI* apresentou uma transcrição 1,5 vezes maior no grupo exposto a $1000 \mu\text{g.L}^{-1}$ após 10 dias de exposição.

Estes resultados estão de acordo com os estudos histológicos e de hibridização *in situ* realizados por REIS (2014) para detecção de *CYP2AUI* em tecidos destes mesmos animais. A autora observou uma maior transcrição deste gene na borda do manto dos animais expostos por 10 dias a $1000 \mu\text{g.L}^{-1}$ de fenantreno. Além disso, foram observadas transcrições de *CYP2AUI* nas células epiteliais do lobo interno e também no lóbulo médio, com uma leve diminuição do sinal no lóbulo exterior do manto. O lobo interno provido de tentáculos, chamado de lobo palial, é o tecido que tem o primeiro contato com a água do ambiente (GALTISOFF, 1964). O lobo médio está mais relacionado ao sistema sensorial e o lobo externo está relacionado com a formação da concha (EBLE & SCRO, 1996).

Interessante mencionar que foi observado um aumento tempo-dependente no número de células mucosas (mucócitos) no manto das ostras expostas a fenantreno que foi associada a maior taxa de acúmulo de fenantreno (REIS, 2014). Este mesmo gene analisado em brânquia e glândula digestiva de ostras expostas a fenantreno $1000\mu\text{g.L}^{-1}$ apresentaram uma indução de 12 e 3 vezes, respectivamente, logo após 24h de exposição (LUCHMANN et al., 2013). Da mesma forma, os estudos de hibridização *in situ* mostraram que a brânquia e a glândula digestiva apresentaram uma transcrição de *CYP2AUI* desde os primeiros dias de exposição enquanto que o manto somente apresentou um aumento significativo após 10 dias de exposição (REIS, 2014). O aumento na transcrição de *CYP2AUI* é mais tardio no manto, em

relação aos outros tecidos, no entanto, este fato pode estar associado aos níveis mais elevados de bioacumulação de fenantreno nos outros tecidos.

Interessantemente, este gene codifica uma proteína que tem cerca de 73% de identidade com a isoforma CYP2AU2 de *C. gigas*, que apresentou uma elevada transcrição no manto, seguida do músculo adutor, glândula digestiva, brânquia e palpos labiais dos animais mantidos em local contaminado por esgoto doméstico (PINO-GOMES, 2013).

Outros genes *CYPs* que apresentaram alterações transcricionais foram os gene *CYP3A-like* e *CYP17A1-like*, sendo o gene *CYP3A-like* aquele que apresentou a maior indução de 2,5 vezes nos animais expostos por 5 dias a concentração de $1000\mu\text{g.L}^{-1}$ e o gene do *CYP17A1-like* apresentou um aumento de 1,2 vezes, nos animais expostos por 1 dia à $1000\mu\text{g.L}^{-1}$.

Os resultados dos transcritos do gene *CYP3A-like* são similares a resultados obtidos por Giuliane e colaboradores (2013) em estudos realizados em mexilhões *Mytilus galloprovincialis* expostos a sedimentos contaminados. Foi observado aumento de 4,7 vezes, na transcrição deste gene associada à presença de hidrocarbonetos no sedimento e bioacumulação pelos animais. No entanto LÜCHMANN *et al.* (2014), não observaram alterações neste gene em brânquias de *C. brasiliensis* expostas a fenantreno.

Em mamíferos as isoformas de CYP3A estão entre as mais abundantes isoformas de CYP e estão envolvidas na biotransformação

da grande maioria dos fármacos e, também, no metabolismo de esteróides (GUENGERICH, 1999). No entanto em invertebrados ainda não está claro se funções biológicas semelhantes estão associadas a estas isoformas. Estudos realizados com o mexilhão *Mytilus edulis* mostraram uma maior transcrição de algumas isoformas de *CYP3A-like* em animais injetados com beta-naftoflavona, um clássico agonista de CYP1A (ZANETTE, 2009). Além disso foi observada uma maior transcrição deste gene nos palpos labiais desta espécie, um órgão responsável pela seleção do alimento, o que sugere um papel importante desta isoforma neste tecido (ZANETTE, 2009).

Os dados do gene *CYP17A1-like* (= *CYP356A1-like*) apresentaram somente um aumento significativo (1,2 vezes) no manto, após 24 h de exposição a 1000 µg.L⁻¹ de fenantreno, apesar de haver uma tendência de maior transcrição nos demais períodos de exposição a esta concentração. Lückmann e seus colaboradores (2014) observaram que animais expostos por 24h a condições semelhantes apresentaram um aumento de 9 vezes na transcrição deste gene nas brânquias, evidenciando uma resposta maior deste gene neste tecido. Resultados obtidos com a isoforma *CYP356A1* em *C. gigas* mostraram níveis transcricionais aumentados em animais mantidos em locais contaminados por esgoto (MEDEIROS et al., 2008; PINO-GOMES, 2013).

Considerando que o *CYP356A1* de *C. gigas* tem 77% de identidade com a *CYP17A1-like* de *C. brasiliensis*, pode-se inferir que esta isoforma esteja associada à metabolização de esteróides e que o aumento da transcrição deste gene esteja associado a uma possível

desregulação endócrina causada pela exposição a altas concentrações de fenantreno. No entanto, estudos subsequentes necessitam ser realizados para confirmar esta hipótese.

Os genes *GST-microsomal 1-like* e *GST π -like* da fase II de biotransformação não apresentaram aumento nas suas transcrições nos animais expostos independente das concentrações ou do tempo de exposição ao fenantreno (Figura 6).

Mesmo que os genes de *GST* não tenham apresentado diferença significativa, ainda assim apresentam resultados interessantes, pois demonstram uma relação similar nos tempos e concentrações, apresentando um aumento moderado da transcrição até 5 dias de exposição. Neste contexto o mesmo ocorreu com os genes relacionados aos CYPs, que apresentaram diferenças significativas principalmente em 1 e 5 dias de exposição.

Estudos anteriores realizados por LÜCHMANN *et al.* (2014) em *C. brasiliensis*, mostraram uma maior transcrição de genes de *GSTs* Ω e *GST microsomal 3* na brânquia dos animais tratados por 24 a 1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de fenantreno. Por outro lado, estes genes não foram alterados na glândula digestiva destes animais.

Igualmente ao presente estudo, a isoforma πGST não apresentou alteração nas brânquias e na glândula digestiva de *C. brasiliensis* expostas a fenantreno (LÜCHMANN *et al.*, 2014). No entanto, mexilhões expostos a sedimentos contaminados apresentaram um aumento (1,6 vezes) na transcrição desta isoforma de πGST (GIULIANI *et al.*, 2013). Da mesma forma, Boutet e colaboradores (2004),

observaram níveis transcricionais mais elevados de *GST* em *C. gigas* expostas a hidrocarbonetos. Medeiros *et al.* (2008) observaram resposta similar em ostras *C. gigas* expostas a esgoto sanitário. Estas diferenças no padrão de resposta entre as espécies pode estar relacionada ao tipo e concentração do contaminante, tempo de exposição, ou mesmo a uma diferença interespecífica no mecanismo molecular de indução na transcrição destes genes.

O resultado mais esperado era que houvesse indução destes genes de fase II pelo fato de que estas enzimas tem a função de conjugação dos compostos para serem eliminados dos organismos, por isso são enzimas atuantes durante a detoxificação de xenobióticos (HANNAM *et al.*, 2010).

Além da associação a biotransformação, o aumento de transcritos de *GST*, pode estar ligado aos sistemas de defesa contra o estresse oxidativo, já que é considerada uma enzima auxiliar no sistema antioxidante e de reparo celular, juntamente com outros genes, tais como a *catalase* (*CAT*), *superóxido dismutase* (*SOD*) e a *glutathione peroxidase* (*GPX*).

No presente estudo não foi observado um aumento na transcrição da *SOD-like* no manto das ostras. Nenhuma alteração foi observado no gene da *Catalase-like* também. Estudo realizado anteriormente por BOUTET *et al.* (2004) mostraram um aumento na transcrição da *SOD*, na glândula digestiva em ostras *C. gigas* expostas por 21 dias, a uma mistura de hidrocarbonetos. No entanto, GIULIANI *et al.* (2013) não observou alteração na transcrição deste gene na glândula digestiva de mexilhões, o mesmo foi observado por GONZALEZ-REY *et al.* (2014)

na glândula digestiva e na brânquia de mexilhões tratados com diferentes xenobióticos.

Trabalhos anteriores com a ostra do mangue *C. brasiliana* exposta a fenantreno não mostraram diferenças nos níveis de transcritos da *CATALASE-like* na brânquia ou na glândula digestiva (LÜCHMANN *et al.*, 2014), assim como nos nossos resultados. Entretanto em mexilhões a *CAT* apresenta alterações na brânquia e na glândula digestiva, sendo significativamente induzida (GIULIANI *et al.*, 2013; GONZALEZ-REY *et al.*, 2014; NAVARRO *et al.*, 2011).

Gonzalez-Rey *et al.* (2014) sugerem que em relação a estes genes, essas respostas são obtidas devido à concentração de enzima requerida, onde quando há a necessidade por parte da célula em sintetizar mais proteína é induzida a transcrição, mas quando existe o suficiente para realizar a eliminação de EROs, o gene passa a ser reprimido.

Ao mesmo tempo em que os xenobióticos induzem os sistemas de biotransformação e defesas antioxidantes, podem também interferir em outros processos celulares essenciais como no desenvolvimento, proliferação celular, no ciclo celular e na apoptose. Inicialmente ocorre a interação do xenobiótico com receptores de hidrocarbonetos aromáticos (Ah), que se ligam a uma proteína citosólica formando o complexo AhR-ligado, o qual é transportado para o núcleo e liga-se a regiões específicas do DNA e inicia a transcrição dos genes requisitados (STEGEMAN & LECH, 1991; REGOLI & GIULIANI, 2014). Esta via de indução pelos xenobióticos é caracterizada em animais vertebrados, mas em bivalves ainda não esta comprovada. Sabe-se que estes animais

apresentam respostas ao estímulo, mas não são conhecidos todos os passos da cascata sinalizadora (REGOLI & GIULIANI, 2014).

Assim sendo nossos resultados apresentam a indução de alguns genes que codificam proteínas essenciais não só para a biotransformação e defesas antioxidantes, mas também para genes relacionados com a apoptose. Em relação a isso, foram analisados cinco genes referentes a apoptose, sendo que destes, três (*Caspase 8-like*, *Caspase 7-like* e *p53-like*) apresentaram níveis transcricionais aumentados.

O gene anti-apoptótico *Bcl-2* não sofreu alterações significativas, este gene é importante na apoptose, por codificar proteínas reguladoras da apoptose pela via intrínseca. O fato de não haver alteração na sua transcrição sugere que as proteínas traduzidas sejam suficientes e que mesmo após 10 dias de exposição não haja alterações em seus níveis. No entanto em peixes-zebra expostos a Carbendazim o gene *Bcl-2* foi reprimido (JIANG *et al.*, 2014), o mesmo ocorreu em cultura de células HepG2 tratadas com extrato de vegetais comestíveis (KYUNG-A *et al.*, 2011), mas em hemócitos de ostras *C. gigas* alimentadas com *Alexandrium catenella* tóxica na concentração de 1×10^6 cel/L, o gene da *Bcl-2* apresentou aumento significativo em sua transcrição (MEDHIOUB *et al.*, 2013).

KYUNG-A *et al.* (2011) mostraram um aumento significativo nos níveis transcricionais da proteína supressora tumoral *p53* possivelmente associado a diminuição da *Bcl-2*, demonstrando a relação de regulação da *p53* sobre a *Bcl-2*, já que uma das funções da proteína *p53* é regular a via intrínseca da apoptose, por ligar-se a uma das

proteínas da família *Bcl-2* e alterar a permeabilidade da membrana mitocondrial, iniciando a via.

Assim nosso resultado mostra que somente depois de 10 dias de exposição é que os níveis apresentaram alterações significativas, e a transcrição é induzida, contudo a *p53* pode estar sendo recrutada para modular a transcrição de genes envolvidos no reparo ao dano no DNA. No entanto, trabalhos com mexilhões mantidos em locais contaminados não apresentaram alterações significativas na *p53* da brânquia e glândula digestiva (LACROIX *et al.*, 2014).

Ao contrário dos genes anti-apoptóticos e da via intrínseca, as caspases apresentaram induções significativas durante a exposição de 1 e 5 dias. Em vertebrados os xenobióticos estimulam a apoptose pela via extrínseca, sendo as caspases as iniciadoras e executoras principais desta via (MEDHIOUB *et al.*, 2013), o mesmo pode ocorrer em invertebrados expostos a xenobióticos. Na *C. brasiliiana* os resultados mostram aumentos significativos nos níveis transcricionais dos 2 genes avaliados, demonstrando uma forte indução da via dependente das *caspases*. As caspases também apresentaram indução significativa em hemócitos de ostras *C. gigas*, sugerindo o estímulo desta via em ostras.

Mexilhões expostos a poluentes apresentaram uma repressão das caspases (3 e 7) ou não sofreram alterações (*caspase 8*) (LACROIX *et al.*, 2014) e o mesmo ocorreu em *peixe-zebra* onde as *caspases 3* e *8* foram reprimidas e a *9* não foi alterada (JIANG *et al.*, 2014). Sendo assim podemos observar que ostras submetidas a diferentes estressores, são susceptíveis a indução de genes da via dependente das caspases na apoptose.

Os resultados apontam a sinalização para o apoptose pela via dependente das caspases, contudo não define que seja necessariamente pela via extrínseca. Pois as caspases estão envolvidas em ambas as vias, e a indução significativa do gene p53-like, podem estar totalmente ligados ao estímulo da via intrínseca. Os resultados indicam que a apoptose está sendo estimulada, podendo ser pela via intrínseca, devido ao fato do excesso de EROs gerados pelos citocromos estar danificando as mitocôndrias, o que pode desencadear o início da apoptose.

Interessantemente os dados observados demonstram que, o manto apresenta respostas tardias à exposição ao fenantreno, quando comparado com a brânquia e a glândula digestiva nesses animais. Isto era esperado, pois é bem caracterizado que a brânquia nesses animais é o órgão principal envolvido na biotransformação de xenobióticos, por isso é susceptível a apresentar respostas rapidamente.

Ao considerarmos todos os resultados apresentados acima, podemos constatar que o fenantreno induz genes das vias de biotransformação e genes relacionados com apoptose em ostras da espécie de *C. brasiliana*. Porém é importante ressaltar que a transcrição, a tradução e a atividade catalítica dessas proteínas podem ou não estarem intimamente ligadas (REGOLI & GIULIANI, 2014). Neste trabalho caracterizamos somente a transcrição dos genes, sendo esta resposta específica e rápida, enquanto a tradução e a atividade catalítica podem apresentar uma resposta tardia.

Enfim todos os dados demonstram as respostas transcricionais causados pelo fenantreno em ostras do mangue *C. brasiliana*, os quais relacionam as formas de defesa do organismo contra este xenobiótico,

buscando a sua eliminação ou sugerindo em alguns casos a morte das células afeta. No entanto, mais estudos são necessários visando entender a atividade catalítica e todos os mecanismos de defesa das células de ostras, pois este trabalho colabora apenas com alguns indícios dos reflexos dos xenobióticos nesses organismos.

6. CONCLUSÕES

- O manto apresenta-se como um tecido susceptível e responsivo a fenantreno em ostras do mangue *C. brasiliiana* e pode ser proposto como órgão complementar na avaliação dos efeitos tóxicos causados pela exposição a hidrocarbonetos.
- Em termos gerais, a transcrição de genes que codificam enzimas da fase I e fase II da biotransformação, de defesa antioxidante e relacionadas com a apoptose foi induzida no manto das ostras expostas a fenantreno, principalmente nas maiores concentrações, sugerindo a existência de algum sistema de sinalização celular que coordena a indução destes genes para desintoxicação do organismo, reparo de danos celulares ou eliminação de células em situação de morte celular, de forma semelhante ao que ocorre em mamíferos.
- Este trabalho mostra que mesmo animais considerados resistentes à exposição a hidrocarbonetos, como bivalves, quando expostos a estes contaminantes, apresentam respostas moleculares que evidenciam o potencial efeito tóxico destes compostos na homeostase do animal.
- Estudos subsequentes devem ser realizados para avaliar a viabilidade de utilização do grau de transcrição dos genes *CYP450 2A1*, *CYP450 17A1-like*, *CYP450 3A-like*, *Caspase 8*, *Caspase 7* e a *p53* como biomarcadores de exposição a

fenantreno ou outro hidrocarboneto policíclico aromático em ambientes costeiros.

- São necessários estudos futuros com biomarcadores de efeito, como peróxidação lipídica, dano ao DNA e citotóxicidade, para avaliar os danos gerados pelo fenantreno, a fim de compreender os mecanismos usados pelo organismo.

REFERÊNCIAS

ALBERS P.H. Petroleum and individual polycyclic aromatic hydrocarbons. In: Hoffman DJ, Rattner BA, Burton GA, Cairns J (eds.), **Handbook of Ecotoxicology**. Lewis Publishers, New York, pp. 1–32, 2003.

AZEVEDO, F.A. & LIMA, I.V. **Toxicocinética**. Em: AZEVEDO F.A.; CHASIN, A.M. As bases toxicológicas da ecotoxicologia. Ed. RiMa, São Carlos-SP, PP. 167-220. 2004.

BAINY, A.C.D., *et al.* Oxidative stress in gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. **Aquatic Toxicology**. v.34. pp. 151-162. 1996.

BAINY, A.C.D. Biochemical responses in penaeids caused by contaminants. **Aquaculture**. v.191. pp. 163–168. 2000.

BANNI, M., *et al.* Acute effects of benzo[a]pyrene on digestive gland enzymatic biomarkers and DNA damage on mussel *Mytilus galloprovincialis*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v.73. pp.842–848. 2010.

BEBIANNI, M.J. & BARREIRA, L.A. Polycyclic aromatic hydrocarbons concentrations and biomarker responses in the clam *Ruditapes decussatus* transplanted in the Ria Formosa lagoon. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 72. pp. 1849-1860. 2009.

BEKKI, K., *et al.* Biological effects of polycyclic aromatic hydrocarbon derivatives. **J. UOEH**. v. 35. pp. 17–24. 2013.

BOUTET, I., TANGUY, A., MORAGA, D. Response of the pacific oyster *Crassostrea gigas* to hydrocarbon contamination under experimental conditions. **Gene**. v. 329. pp. 147-157. 2004.

BOWEN, R.E. & DEPLEDGE, M.H. Rapid assessment of marine pollution (RAMP). **Marine Pollution Bulletin**. v. 53. pp. 631-639. 2006.

CAJARAVILLE, M.P., *et al.* The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: \na practical approach. **The Science of the Total Environment**. v. 247. pp. 295-311. 2000.

CALVAR, N.E., *et al.* Genes of the mitochondrial apoptotic pathway in *Mytilus galloprovincialis*. **Plos/one**. v.8. 2013.

CHAVAN, H. & KRISHNAMURTHY, P. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) mediate transcriptional activation of the ATP binding cassette transporter ABCB6 gene via the aryl hydrocarbon receptor (AhR). **The Journal of biological chemistry**. v. 287. pp. 32054-32068. 2012.

CIRCU, M.L. & AW, T.Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 48. pp. 749-762. 2010.

DONEY, S.C. The growing human footprint on coastal and open-ocean biogeochemistry. **Science**. v. 328. pp. 1512-1516. 2010.

EBLE, A. F. & SCRO, R. General Anatomy In: KENNEDY, V.S, NEWELL, R.I.E; EBLE, A.F (Eds.) **The Eastern Oyster Crassostrea virginica**. Maryland: Maryland Sea Grant College, p.19-73, 1996.

FERNICOLA, N.A.G.G., BOHRER-MOREL, M.B.C., BAINY, A.C.D. **Ecotoxicologia**. Em: AZEVEDO F.A.; CHASIN, A.M. As bases toxicológicas da ecotoxicologia. Ed. RiMa, São Carlos-SP, pp. 221-243. 2004.

FERREIRA, J.F. & OLIVEIRA NETO, F.M. Cultivo de moluscos em Santa Catarina. **INFOFISH**, v. 4, 2006.

GALTISOFF, P.S. **The American Oyster Crassostrea Virginica Gmelin**. United States Department of the Interior, Washington, D.C. 1964.

GIULIANI, M.E., *et al.* Transcriptional and catalytic responses of antioxidant and biotransformation pathways in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to chemical mixtures. **Aquatic Toxicology**. v.134-135. pp.120- 127. 2013.

GONZALEZ-REY, M., *et al.* Effects of active pharmaceutical ingredients mixtures in mussel *Mytilus galloprovincialis*. **Aquatic Toxicology**. v. 153. pp. 12-26. 2014.

GUENGERICH, F. P. Cytochrome P-450 3A4: Regulation and role in drug metabolism. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 39, p. 1-17. 1999.

HALPERN, B.S., *et al.* A global map of human impact on marine ecosystems. **Science**. v. 319. pp. 948-952. 2008.

HANNAM, M.L., *et al.* Effects of the model PAH phenanthrene on immune function and oxidative stress in the haemolymph of the temperate scallop *Pecten maximus*. **Chemosphere**. v. 78. pp. 779-784. 2010.

HAYES, J.D. & PULFORD, D.J. The glutathione s-transferase supergene family : regulation of *gst ** and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**. v.30. pp.445-600. 1995.

HAYES, J.D., FLANAGAN, J.U., JOWSEY, I.R. GLUTATHIONE TRANSFERASES. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**. v. 45. pp. 51-88. 2005.

HEATH, M.R. Comment on "A global map of human impact on marine ecosystems". **Science**. v. 321. 2008.

IRWIN, R.J., *et al.* Colorado: National Park Service, Water Resources Division, Fort Collins. 1997.

JIANG, J., *et al.* Embryonic exposure to carbendazim induces the transcription of genes related to apoptosis, immunotoxicity and endocrine disruption in zebra fish (*Danio rerio*). **Fish and Shellfish Immunology**. v. 41. pp. 493-500. 2014.

KARPINICH, N.O., *et al.* The Course of etoposide-induced apoptosis from damage to DNA and p53 activation to mitochondrial release of

cytochrome *c*. **Journal of Biological Chemistry** v. 277. pp.16547-16552. 2002.

KISS, T. Apoptosis and its functional significance in molluscs. **Apoptosis**. v.15. pp.313–321. 2010.

KOUTSOGIANNAKI, S., *et al.* Oxidative stress parameters induced by exposure to either cadmium or 17-estradiol on *Mytilus galloprovincialis* hemocytes. The role of signaling molecules. **Aquatic Toxicology**. v.146. pp.186–195. 2014.

KYUNG-A, H., *et al.* In vitro investigation of antioxidant and anti-apoptotic activities of Korean wild edible vegetable extracts and their correlation with apoptotic gene expression in HepG2 cells. **Food Chemistry**. v. 125. pp. 483-487. 2011.

KUSUHARA, H., *et al.* Reactive oxygen species are involved in the apoptosis induced by nonsteroidal anti-inflammatory drugs in cultured gastric cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 383. n. 3. pp. 331-337, 1999.

LACROIX, C., *et al.* A selection of reference genes and early-warning mRNA biomarkers for environmental monitoring using *Mytilus* spp. as sentinel species. **Marine Pollution Bulletin**. v. 86. pp. 304-313. 2014.

LAZOSKI, C., *et al.* Phylogeny and phylogeography of atlantic oyster species: evolutionary history, limited genetic connectivity and isolation by distance. **Marine Ecology Progress Series**. v. 426. pp. 197-212. 2011.

LIN, D., TU, Y., ZHU, L. Concentrations and health risk of polycyclic aromatic hydrocarbons in tea. **Food and Chemical Toxicology**. v. 43. pp. 41-48. 2005.

LIVINGSTONE, D.R. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. **Marine Pollution Bulletin**. v. 42. pp. 656-666. 2001.

LÜCHMANN, K.H., *et al.* Biochemical biomarkers and hydrocarbons concentrations in the mangrove oyster *Crassostrea brasiliiana* following

exposure to diesel fuel water-accommodated fraction. **Aquatic Toxicology**. v. 105. pp. 652-660. 2011.

LÜCHMANN, K.H., *et al.* Suppressive subtractive hybridization libraries prepared from the digestive gland of the oyster *Crassostrea brasiliana* exposed to a diesel fuel water-accommodated fraction. **Environmental Toxicology and Chemistry**. v. 31. pp. 1249-1253. 2012.

LÜCHMANN, K.H., *et al.* A light in the darkness: new biotransformation genes, antioxidant parameters and tissue-specific responses in oysters exposed to phenanthrene. **Aquatic Toxicology**. v. 152. pp. 324-334. 2014.

MEDEIROS, I.D., *et al.* Induced gene expression in oyster *Crassostrea gigas* exposed to sewage. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. v. 26. pp. 362-365. 2008.

MEDHIOUB, W., *et al.* Exposure to the neurotoxic dinoflagellate, *Alexandrium catenella*, induces apoptosis of the hemocytes of the oyster, *Crassostrea gigas*. **Marine Drugs**. v. 11. pp.799-814. 2013.

MEYER, U. Overview of enzymes of drug metabolism, **Journal of Pharmacokinetic and Biopharmaceutics**, v. 24, n. 5, pp. 449–459, 1996.

MOLL, U.M., *et al.* Transcription-independent pro-apoptotic functions of p53. **Current Opinion in Cell Biology**. v.17, pp. 631–636. 2005.

MONSERRAT, J.M., *et al.* Pollution biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**. v. 146. pp. 221-234. 2007.

MOORE, M.N., *et al.* An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**. v. 552. pp. 247-268. 2004.

NAVARRO, A., *et al.* Transcriptional response of stress genes to metal exposure in zebra mussel larvae and adults. **Environmental Pollution**. v. 159. pp. 100-107. 2011.

OGURA, S. & SHIMOSAWA, T. Oxidative stress and organ damages. **Current Hypertension Reports**. v. 16. pp. 452. 2014.

OMIECINSKI, C.J., *et al.* Xenobiotic metabolism, disposition , and regulation by receptors : from biochemical phenomenon to predictors of major toxicities. **Toxicological Sciences**. v. 120. pp. S49–S75. 2011.

ORELLANA, M.B. & GUAJARDO, V.T. Actividad del citocromo P450 y su alteración em diversas patologías. **Rev. Méd. Chile**. v.1323. p.85-94. 2004.

PALAZZI, G., *et al.* Biodiversidade Aquática. Ministério do Meio Ambiente. 2014.

PARKINSON, A. Biotransformation of xenobiotics casarett and Dull's Toxicology: The basic sciense of poisons, **Curts D Klaassen, Kansas, McGraw – Hill**, p. 161 – 303, 2008.

PARRILLA-TAYLOR, D.P. & ZENTENO-SAVÍN, T. Antioxidant enzyme activities in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in response to environmental hypoxia and reoxygenation. **Aquaculture**. v.318. pp.379–383. 2011.

PEDROZO, M.F.P. **Toxicovigilância (monitorização) da exposição de populações a agentes tóxicos**. Em: AZEVEDO F.A.; CHASIN, A.M. As bases toxicológicas da ecotoxicologia. Ed. RiMa, São Carlos-SP, pp. 167-220. 2004.

PINO GOMES, R. **TRANSCRIÇÃO DE GENES CITOCROMO P450 EM OSTRÁ *Crassostrea gigas***. 2013. pp.109. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Biociências) Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis – SC.

PORTT, L. *et al.* Anti-apoptosis and cell survival: A review. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1813. p.238-259. 2011.

PUSHPARAJAH, D. S., *et al.* Up-regulation of the glutathione S-transferase system in human liver by polycyclic aromatic hydrocarbons; comparison with rat liver and lung. **Mutagenesis**. v. 23. n. 4. pp. 299–308. 2008.

QU, T., *et al.* Identification and functional characterization of two executioner caspases in *Crassostrea gigas*. **Plos/one**. v. 9. 2014.

RAMDINE, G., *et al.* Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in surface sediment and oysters (*Crassostrea rhizophorae*) from mangrove of Guadeloupe: Levels, bioavailability, and effects. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 79. pp. 80-89. 2012.

REIS, I.M.M. **Histopatologia e hibridização *in situ* de citocromo P450 (CYP2A1) em ostras *Crassostrea brasiliiana* expostas ao fenantreno**. 2014. 97p. (Dissertação de mestrado) Programa de pós-Graduação em Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2014.

REIS-HENRIQUES, M.A., *et al.* Phenanthrene and nitrite effects on juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*, using hepatic biotransformation enzymes, biliary fluorescence, and micronuclei as biomarkers. **Ciencias Marinas**. v. 35. pp. 29-40. 2009.

REWITZ, K. F., *et al.* Marine invertebrate cytochrome P450: Emerging insights from vertebrate and insect analogies. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 143, p. 363-381, 2006.

REGOLI, F. & GIULIANI, M.E. Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms. **Marine Environmental Research**. v. 93. pp. 106-117. 2014.

RODRIGUES-SILVA, C., *et al.* Expression and immunohistochemical localization of the cytochromeP450 isoform 356A1 (CYP356A1) in oyster *Crassostrea gigas*. **Aquatic Toxicology**. v.159. p.267–275. 2015.

RUPPERT, E. E.; FOX, R. S.; BARNES, R. D. **Zoologia dos invertebrados**. Editora Roca LTDA, 7ª edição, São Paulo, 2005.

SCHULTZ, D.R. & HARRINGTON JR, W.J. Apoptosis: Programmed cell death at a molecular level. ***Seminars in Arthritis and Rheumatism***. v. 32. pp 345-369. 2003.

SCHULZE-OSTHOFF, K., *et al.* Apoptosis signaling by death receptors. ***European Journal of Biochemistry***. v. 254. pp. 439-459. 1998.

SERRANO, M.A.S., *et al.* Differential gene transcription, biochemical responses, and cytotoxicity assessment in Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to ibuprofen. ***Environ Sci Pollut Res***. 2015.

STEGEMAN, J.J. & LECHT, J.J. Cytochrome P-450 Monooxygenase systems in aquatic species : carcinogen metabolism and biomarkers for carcinogen and pollutant exposure. ***Environmental Health Perspectives***. v.90. pp. 101-109. 1991.

TERAHARA, K. & TAKAHASHI K.G. Mechanisms and immunological roles of apoptosis in molluscs. ***Current Pharmaceutical Design***. v. 14, pp. 131-137. 2008.

TREVISAN, R., *et al.* The biological importance of glutathione peroxidase and peroxiredoxin backup systems in bivalves during peroxide exposure. ***Marine Environmental Research***. v.101. pp.81-90. 2014.

VALAVANIDIS, A., *et al.* Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. ***Ecotoxicology and Environmental Safety***. v. 64. pp. 178-189. 2006.

WERK-REICHHART, D. & FEYEREISEN, R. Cytochromes P450: a success story. ***Genome Biology***, v. 1, 2000. Protein family review.

YIN, Y., *et al.* Bioaccumulation and ROS generation in liver of *Carassius auratus* , exposed to phenanthrene. v. 145. pp. 288-293. 2007.

ZANGAR, R. C.; DAVYDOV, D. R.; VERMA, S. Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. ***Toxicology and Applied Pharmacology***. v. 199, n. 3, pp. 316-331. 2004.

ZANETTE, J., *et al.* New cytochrome P450 1B1, 1C2 and 1D1 genes in the killifish *Fundulus heteroclitus*: Basal expression and response of five killifish *CYP1s* to the AHR agonist PCB126. **Aquatic Toxicology**, v. 93, n. 4, p. 234-243, 2009.

ZANETTE, J., *et al.* Identification of CYP genes in *Mytilus* (mussel) and *Crassostrea* (oyster) species: First approach to the full complement of cytochrome P450 genes in bivalves. **Marine Environmental Research**. v. 69. pp. S1-S3. 2010.

ZHANG, G., *et al.* The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature*. v.490. pp. 49-54. 2012.

ZHONG, Y. **Phenanthrene tetraols as probes for the metabolic activation of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in humans**. pp.161. Tese (Doctor of Philosophy) - Faculty of the Graduate School, University of Minnesota, Minnesota. 2011.